

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression der Cyclooxygenase-2 im Mammakarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Berit Maria Müller
aus Bernau (bei Berlin)

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Hauptmann
 2. Prof. Dr. S. H. Heywang-Köbrunner
 3. Prof. Dr. med. Chr. Thomssen

Datum der Promotion: 24.01.2005

Zusammenfassung:

Cyclooxygenasen regulieren die Produktion von Prostaglandinen und spielen eine Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Tumore. Versuche mit COX Inhibitoren (NSAIDs) zeigten im Tiermodell eine deutliche Reduktion von Inzidenz und Größe der Tumoren in einer dosisabhängigen Weise.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Expressionsmuster der induzierbaren Isoform COX-2 und der konstitutiven Isoform COX-1 im Mammakarzinom zu untersuchen.

Die Grundlage der Untersuchung bildeten Tumorproben von 221 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Diese wurden mittels immunhistochemischer Methoden auf beide COX-Isoenzyme untersucht.

Eine erhöhte COX-2 Expression wurde in 36% der untersuchten Mammakarzinome festgestellt. Sie korrelierte signifikant mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere mit einem positiven Lymphknotenstatus, einer geringen Differenzierung und einer Tumorgroße >20 mm. Eine erhöhte COX-1 Expression wurde in 45% der untersuchten Tumoren gefunden und korrelierte signifikant mit kleineren und nicht in regionäre Lymphknoten metastasierten Karzinomen.

In der univariaten Überlebensanalyse stellte sich eine positive COX-2 Expression im Gegensatz zur COX-1 sowohl im rezidivfreien Überleben als auch im Gesamtüberleben als prognostisch relevant heraus. In der multivariaten Analyse erreichte eine erhöhte COX-2 Expression eine grenzwertige statistische Signifikanz als unabhängiger Parameter innerhalb des rezidivfreien Überlebens. Eine erhöhte COX-1 Expression erreichte keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Prognose.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist somit eine erhöhte COX-2 Expression im Mammakarzinom mit prognostisch ungünstigen Faktoren assoziiert. Inwieweit selektive COX-2 Inhibitoren als Therapeutika geeignet sind, werden die Ergebnisse weiterer Studien zeigen.

Mammakarzinom, Cyclooxygenasen, Prognosefaktor, NSAID

Abstract:

Cyclooxygenases regulate the production of prostaglandins and play a role in tumor development and progression. COX-inhibitors (NSAIDs) showed a significant reduction of tumor incidence and tumor size in rodent models.

In this study, we investigated the prognostic impact of expression of both COX-isoforms as well as the association of COX expression and other clinicopathological parameters in primary breast cancer.

The expression of COX-1 and -2 was determined by immunohistochemistry retrospectively in a cohort of 221 women.

An elevated expression of COX-2 as the inducible form of the cyclooxygenases was detected in 36% of tumors and was significantly associated with several clinicopathological parameters, for example positive nodal status, poor differentiation and larger tumor size. In contrast, an increased expression of COX-1 was detected in 45% of breast carcinomas and was associated with smaller tumor size and negative nodal status.

In univariate survival analysis a significant association between an increased expression of COX-2 and a decreased disease-free survival as well as decreased overall survival was found. An elevated expression of COX-1 had no significant influence on patient prognosis.

The data of this study show a prognostic role of COX-2 expression. Further studies on selective COX-2 inhibitors will investigate their role in treatment of patients with breast cancer.

breast cancer, cyclooxygenases, prognostic factor, NSAID

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	6
1.1	Das Mammakarzinom	6
1.1.1	Epidemiologie, Histologie und Therapie	6
1.1.2	Risikofaktoren	7
1.2	Zusammenhang zwischen Entzündungen und malignen Tumoren	7
1.3	Entdeckung der Cyclooxygenase in Beziehung zu den NSAIDs	8
1.4	Rolle der Cyclooxygenasen im Arachidonsäurestoffwechsel	10
1.5	Unterschiede zwischen COX-1 und COX-2	11
1.6	Kolonkarzinom und COX-2 Expression	14
1.6.1	Zusammenhang zwischen Kolonkarzinogenese und COX-2	14
1.6.2	Positive Wirkungen der NSAIDs in der Therapie intestinaler Tumoren	14
1.7	Protektive Effekte der NSAIDs in der Prävention des Mammakarzinoms	15
1.8	Zielstellung	17
2	<i>Material und Methoden</i>	18
2.1	Patientenkollektiv	18
2.2	Material	20
2.2.1	Zelllinien	20
2.2.2	Chemikalien und Enzyme	20
2.2.3	Kits	22
2.2.4	Lösungen, Kulturmedien	23
2.2.5	Verbrauchsmaterial	26
2.2.6	Geräte	28
2.3	Methoden	29
2.3.1	Histopathologische Untersuchung	29

2.3.2	Immunhistochemie	29
2.3.3	Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung	30
2.3.4	Angaben zur Statistik	31
2.3.5	Zellkultur	31
2.3.6	Versuchsanordnung	32
2.3.7	Proteinisolierung	32
2.3.8	Proteinkonzentrationsbestimmung	33
2.3.9	Western Blot	33
3	<i>Ergebnisse</i>	34
3.1	Expression von COX-2 und COX-1 im Normalgewebe	34
3.2	Expression von COX-2 und COX-1 im Mammakarzinom	34
3.3	Korrelation der COX mit klinisch-pathologischen Parametern	35
3.3.1	Korrelation der COX-2 mit klinisch-pathologischen Parametern	35
3.3.2	Korrelation der COX-1 mit klinisch-pathologischen Parametern	38
3.4	Univariate Überlebensanalyse	45
3.4.1	Prognoserelevante klinisch-pathologische Parameter	45
3.4.2	Prognostische Bedeutung der COX-2 Expression	48
3.4.3	Prognostische Bedeutung der COX-1 Expression	50
3.5	Multivariate Überlebensanalyse	54
3.6	Zelllinien	56
3.7	Immunhistochemische Ergebnisse	57
4	<i>Diskussion</i>	60
4.1	Korrelationen der COX-2 mit prognostisch ungünstigen Faktoren	60
4.2	COX-2 als prognoserelevanter Überlebensparameter	63
4.3	Unterstützende Ergebnisse aus Tier- und Zellkulturmodellen	64
4.4	Mögliche Erklärungen für eine präferente Expression der COX-2	66

4.5	Mechanismen der COX-2 in der Tumorgenese	67
4.6	Therapeutischer Ausblick	69
5	<i>Anhang</i>	71

Widmung

Gewidmet meinen Eltern.

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95%iges Konfidenzintervall
APC	Adenomatosis polyposis coli
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ep-CAM	epithelial cellular adhesion molecule
HER-2/ neu (=c-erb-B2)	human epidermal growth factor receptor-2 (=cellular-Avian-erythroblastosis-Virus-B2)
IL-1 β	Interleukin-1 β
IRS	Immunreaktiver Score
NF κ B	nuclear factor kappa b
NSAID	non-steroidal antiinflammatory drugs (Nicht-steroidale Antirheumatika)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RR	relatives Risiko
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	tissue plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Histologie und Therapie

Das Mammakarzinom ist mit 46.000 bis 50.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau. In Berlin betrug in den Jahren 1997-1998 die altersstandardisierte Inzidenz je 100.000 mit der Europabevölkerung als Altersstandard 82,2 [1]. In den USA rechnet man für das Jahr 2002 mit 203.500 Neuerkrankungen [2]. Schätzungsweise jede zehnte Frau bekommt im Laufe ihres Lebens einen solchen Tumor. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63,5 Jahren.

Am Mammakarzinom sterben pro Jahr in Deutschland 19.000 Frauen. Im Alter zwischen 35 und 55 Jahren ist er die häufigste Tumortodesursache im weiblichen Geschlecht überhaupt. Bezüglich der Sterblichkeit an Tumorerkrankungen nimmt das Mammakarzinom in Deutschland mit 18% aller Todesfälle an bösartigen Tumoren den dritten Platz nach den Bronchial- und kolorektalen Karzinomen ein. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 73%.

Ergebnisse globaler epidemiologischer Studien zeigen, daß die Inzidenz des Mammakarzinoms ein Häufigkeitsmaximum in den USA und ein Minimum in Japan aufweist und somit eine unterschiedliche geographische Verteilung zeigt.

Histologisch unterteilt man die Mammakarzinome in intraduktale (nicht-invasive) und invasive Tumoren. Letztere gliedern sich in duktale, lobuläre und seltenere Varianten (tubuläre, papilläre, muzinöse, medulläre, adenoidzystische und apokrine). Das invasiv-duktales Karzinom ist mit 80% der häufigste Karzinomtyp der Brustdrüse [3][4][5].

Die Therapie ist u.a. abhängig von Tumorgröße, histologischem Typ, Multifokalität und insbesondere bei der operativen Therapie (brusterhaltend oder Ablatio) vom Wunsch der Patientin. Als Alternative zur offenen Lymphonodektomie wird heute die alleinige Exstirpation des Sentinel Lymph Node angestrebt. Eine primär systemische Chemotherapie soll präoperativ eine Verkleinerung der Tumoren >3 cm bewirken sowie bereits das Ansprechen der Chemotherapie zeigen. Standardtherapie bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus ist eine tägliche Einnahme von Tamoxifen über

5 Jahre, alternativ mit Aromataseinhibitoren. Aus den verschiedenen Chemotherapeutika war und ist das CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) Standard. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer adjuvanten Strahlentherapie sowie innerhalb einer palliativen Behandlung einer Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) [6].

1.1.2 Risikofaktoren

Ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms ist das Alter. So liegt die altersspezifische Inzidenz zwischen 50 und 70 Jahren um den Faktor 5 höher als im Alter zwischen 35 und 40 Jahren. Die familiäre Belastung ist ein weiterer starker Risikofaktor. Das Auftreten eines Mammakarzinoms bei einer Verwandten ersten Grades (Mutter oder Schwester) steigert das persönliche Risiko um den Faktor 3-4. Ferner erhöht bei diesen Frauen eine Keimbahnmutation im BRCA-1 Gen (Chromosomenloкус: 17q21) das Risiko gegenüber einer familiär nicht belasteten Frau um das 7-8fache. Es wird geschätzt, daß in 60-70% aller erblichen Mammakarzinome eine Mutation im BRCA-1 oder BRCA-2 Gen vorliegt. Frauen mit Mutationen dieser Gene haben ein 50-80%iges Risiko, hieran ein Karzinom zu entwickeln. Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen p53 sind ebenso mit einem erhöhten Risiko, insbesondere bei jüngeren Frauen, assoziiert. Ein weiterer Risikofaktor ist ein in der Vergangenheit aufgetretenes Mammakarzinom, welches ein 5fach höheres Rezidivrisiko zur Folge hat.

1.2 Zusammenhang zwischen Entzündungen und malignen Tumoren

Bereits Rudolf Virchow vermutete 1863 anhand leukozytenreicher Infiltrate in malignen Tumoren einen Zusammenhang zwischen diesen und Entzündungen; insbesondere der Bildung von Karzinomen an Orten, die vorher Sitz einer Entzündung waren [7]. Dvorak verglich 1986 die inflammatorischen Prozesse in Tumoren mit denen einer gestörten Wundheilung [8]. Bis heute ist die Rolle der Entzündung für das Karzinomwachstum noch nicht vollständig geklärt.

Einen großen Anteil an den entzündlichen Stromainfiltraten einiger maligner Tumore (z.B. Mammakarzinom, Kolorektales Karzinom) bilden Tumor-assoziierte Makrophagen, welche von zirkulierenden monozytären Vorläuferzellen abstammen. Verantwortlich für die Akkumulation dieser Makrophagen sind bestimmte chemotaktische Mediatoren (z.B. MCP-1 [monocyte chemoattractant protein]), welche von den Tumorzellen produziert werden. Die Fähigkeiten der Makrophagen sind vielfältig, u.a. können sie Wachstumsfaktoren und Proteasen (Modulation der extrazellulären Matrix durch z.B. Matrixmetalloproteinasen) produzieren, die Tumorphilisation anregen sowie die Angiogenese und Invasion fördern. Weiterhin tragen Makrophagen durch Produktion verschiedener Gerinnungsfaktoren zur Fibrinpolymerisation im Tumorstroma bei.

Untersuchungen zeigten, daß viele Tumorzelllinien selbst proinflammatorische Zytokine produzieren können. So konnte in Ovarialkarzinomzelllinien mit Hilfe eines Matrix-Invasionsassays die Förderung der Invasion durch IL-1 β und TNF α nachgewiesen werden. Interessanterweise wirken diese Mediatoren in anderen Zelllinien als Wachstumsfaktoren. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede liegt wahrscheinlich im Auslösen bestimmter Signaltransduktionswege (z.B. p38 MAPK) durch die proinflammatorischen Zytokine [7][9].

In diesem Zusammenhang wirken auch weitere Entzündungsprozesse als neue Ziele der Tumorforschung. So stellt die Cyclooxygenase, deren Expression in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ein wichtiges Element innerhalb inflammatorischer Prozesse dar. Besonders die Expression der Cyclooxygenase-2 als möglicher interessanter Prognoseparameter erwies sich in verschiedenen vorangegangenen Untersuchungen spezifisch für maligne Tumore.

1.3 Entdeckung der Cyclooxygenase in Beziehung zu den NSAIDs

Schon im antiken Griechenland, wo Rindenextrakte aus Pappeln oder Weiden als Therapeutikum Verwendung fanden, liegen die Ursprünge für die Verwendung acetylsalicylsäurehaltiger Verbindungen als Antipyretikum und Analgetikum. Auch Hippocrates beschrieb die analgetischen Wirkungen der Säfte der Pappel bei Augenleiden und die antipyretischen Effekte der Weidenrinde bei Fieber.

Im Jahr 30 n. Chr. definierte Celsius die vier klassischen Entzündungszeichen (rubor, calor, dolor und tumor) und benutzte zu deren Behandlung ebenfalls Extrakte der Weidenrinde. Auch in Asien, Nordamerika und Südafrika machte man sich zu dieser Zeit die genannten antipyretischen Effekte zu Nutze. Im Mittelalter wurden die Anwendungsgebiete dieser Extrakte weiter ausgedehnt. Über erste „klinische Versuche“ mit den Auszügen der Weidenrinde wurde im Jahre 1763 durch Reverend Edward Stone aus Oxfordshire berichtet, welcher beeindruckt von der erfolgreichen therapeutischen Wirkung zu weiteren Versuchen aufrief, um weltweit von diesem Wirkstoff zu profitieren.

Die aktive und bittere Komponente des Baumextraktes der Weißen Weide (*Salix alba vulgaris*) ist 1829 durch den Franzosen Leroux als Salicin, einem Glykosid des Salicylates, identifiziert worden. Acetylsalicylsäure wurde zum ersten Mal 1853 von Charles Gerhardt synthetisiert, dessen Produkt jedoch vorerst keine weitere Verbreitung fand.

In Deutschland konnte Salicylsäure erstmals 1874 von Kolbe und Lautemann aus Phenol und Carbondioxid hergestellt werden. Acetylsalicylsäure als wohlschmeckendere Form wurde wenig später von Felix Hoffmann der Bayer Company hergestellt und 1899 von Heinrich Dreser als „Aspirin“ bezeichnet, wobei das „a“ im Namen an die Acetylgruppe und das „spirin“ an die botanische Spiraea erinnern soll, aus welcher Salicylat extrahiert werden kann.

Zum Beginn des 20. Jahrhunderts folgte die Entwicklung weiterer Medikamente, die vergleichbare klinische Effekte mit dem Aspirin erzielten, so z.B. Phenylbutazon, Naproxen und Indomethacin. Aufgrund dieser ähnlichen therapeutischen Wirkungen wurden sie „Aspirin-like drugs“ genannt. Wegen der deutlichen Unterschiede zu den in inflammatorischen Prozessen ebenso eingesetzten Glukokortikoiden folgte die Bezeichnung „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs). Der genaue Wirkmechanismus dieser Pharmazeutika blieb bis zur Entdeckung der Prostaglandine unbekannt. Piper und Vane konnten dann den ersten Zusammenhang zwischen der Prostaglandinproduktion und der Wirkungsweise aspirinähnlicher Medikamente zeigen und veröffentlichten diese Ergebnisse im Jahre 1971 [10]. Die Basis ihrer Hypothese hinsichtlich der inflammatorischen Prozesse stellte die Rolle der lokalen Prostaglandinproduktion in diesen dar. Trotz ihres unterschiedlichen chemischen

Aufbau ist das Hauptziel aller NSAIDs die Inhibition der Cyclooxygenase und der Prostaglandinproduktion.

Eine gereinigte und enzymatisch aktive Form der Cyclooxygenase (oder Prostaglandin Endoperoxid Synthase), heute die COX-1, wurde 1976 isoliert. Im Jahre 1990 wiesen Experimente auf die Existenz weiterer Isoformen hin. Die cDNA der Cyclooxygenase-2 (Mitogen-induzierbare Prostaglandin G/H Synthase oder PGH Synthase 2) wurde 1991 isoliert und sequenziert [11][12].

1.4 Rolle der Cyclooxygenasen im Arachidonsäurestoffwechsel

Die Cyclooxygenase katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin H_2 über die Bildung von Prostaglandin G_2 als Übergangsform. Sie beinhaltet 2 katalytische Funktionen: eine Oxidase und eine Peroxidase (Abb. 1).

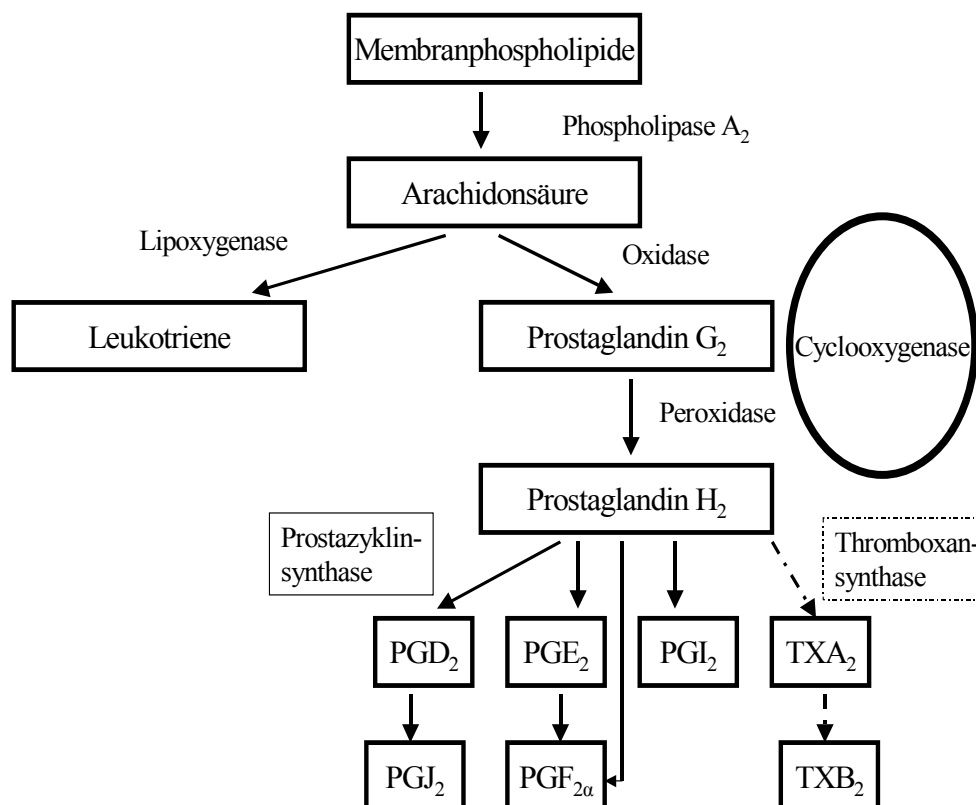


Abb. 1: Der Arachidonsäurestoffwechsel

PGH₂ ist das unmittelbare Substrat für eine Reihe zellspezifischer Prostaglandin- und Thromboxansynthasen. Prostaglandine werden in verschiedenen Geweben synthetisiert und dienen als auto- oder parakrin wirkende Mediatoren. Welche Prostaglandine gebildet werden, hängt von der enzymatischen Ausstattung der jeweiligen Zelle ab [13].

Die Signale dieser Moleküle werden hauptsächlich über 2 verschiedene Wege weitergeleitet. So interagiert ein Teil der Prostaglandine mit Zellrezeptoren, die der Gruppe der G-Protein gebundenen Rezeptoren zuzuordnen sind. Diese sind wiederum an zytosolische Signalwege gekoppelt, welche in diversen physiologischen Antworten (z.B. Relaxation/Kontraktion glatter Muskelzellen, Plättchenaggregation, Gefäßpermeabilität) resultieren. Desweiteren können G-Protein gekoppelte Signalwege chronische Prozesse wie Angiogenese induzieren. Studien zeigten, daß der EP₂-Subtyp des PGE-Rezeptors in den G_s/cAMP/Proteinkinase A-Signalweg involviert ist, welcher vermutlich zu einer höheren VEGF-Transkription beiträgt.

Im Gegensatz dazu interagieren andere Prostaglandine wie PGJ₂ oder PGA₂ mit nukleären Rezeptoren. Diese „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) bilden mit dem 9-cis-Retinoidsäurerezeptor (RXR) ein Heterodimer, binden als solches an ein sequenzspezifisches Response-Element und induzieren somit direkt im Nucleolus die Transkription.

Die Aktivität der Peroxidase ist für die hohe enzymatische Synthese der Prostaglandine verantwortlich. Sie dient weiterhin u.a. zum Aktivieren redoxabhängiger Signalwege und zur Stimulation der NFκB-Aktivität.

1.5 Unterschiede zwischen COX-1 und COX-2

Die Proteine der beiden im luminalen Kompartiment des endoplasmatischen Retikulums und an der nukleären Membran lokalisierten Isoformen sind in der Aminosäuresequenz zu ca. 60% identisch [14].

Während die Cyclooxygenase-1 als sogenanntes „house keeping gene“ konstitutiv ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression der mit einem größeren aktiven Zentrum versehenen Cyclooxygenase-2 abhängig von der Induktion durch bestimmte

Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Zytokine (z.B. IL-1) und Onkogene (z.B. HER-2/neu).

Tabelle 1: Unterschiede zwischen beiden Isoenzymen der Cyclooxygenase nach Taketo (1998) [12]

	COX-1	COX-2
Genlokus	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
Gengröße	22 kb	8 kb
	11 Exone	10 Exone
Größe der m-RNA	2,8 kb	4,0 kb
Molekulargewicht der Proteine	85.000 Da	72.000 Da

Eine erhöhte COX-2 Expression findet sich in bestimmten Regionen des Gehirns, der Niere, in aktivierten Makrophagen, Synoviozyten, Entzündungsprozessen und malignen epithelialen Zellen. Untersuchungen an COX-2 knockout Mäusen zeigen, daß diese Isoform wichtig für die postnatale Entwicklung der Niere und für verschiedene weibliche Reproduktionsprozesse (Ovulation, Fertilisation, Implantation und Dezidualisierung) ist [15].

Im Gegensatz dazu weisen COX-1 knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen keine auffällige gastrale Pathologie sowie weniger Indomethacin-induzierte Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt auf. Desweiteren zeigen die Tiere neben einer reduzierten Thrombozytenaggregationsfähigkeit eine verringerte inflammatorische Antwort auf Arachidonsäure [16].

Konventionelle NSAIDs wie Aspirin oder Ibuprofen inhibieren in unterschiedlichem Ausmaß beide Isoformen der Cyclooxygenase (Tabelle 2). Die Blockade der COX-1 z.B. ist für deren gastrale Nebenwirkung verantwortlich, wohingegen die therapeutisch

erwünschten antiinflammatorischen Effekte vorwiegend auf Blockierung der COX-2 beruhen.

Acetylierung der COX-1 durch Aspirin inaktiviert die Aktivität der in Abb. 1 dargestellten Oxidase, jedoch nicht die der Peroxidase. Im Gegensatz dazu modifiziert die Acetylierung der COX-2 durch Aspirin deren Oxidase-Aktivität und produziert 15R-Hydroxyeicosatetranoidsäure (15R-HETE).

Selektive COX-2 Inhibitoren wie Celecoxib (Celebrex[®]: Pharmacia GmbH, Heumann, SEARLE, Pfizer, Mack, Illert., Parke-Davis) und Rofecoxib (Vioxx[®]: MSD) wurden entwickelt und zeigten in verschiedenen Studien eine mit nichtselektiven NSAIDs vergleichbare antiinflammatorische, jedoch innerhalb des Gastrointestinaltraktes verträglichere Wirkung [17].

Tabelle 2: Relative Potenz einiger analgetisch/antipyretisch/antiphlogistischer Wirkstoffe hinsichtlich der Hemmung von COX-1 und COX-2 im humanen Vollblutassay [18]

Substanz	COX-1/COX-2 – IC50-Verhältnis
Ibuprofen	0,50
Naproxen	0,56
Indometacin	1,90
Piroxicam	3,10
Nimesulid	17,70
Diclofenac	18,90
Celecoxib	>100
Rofecoxib	>200

1.6 Kolonkarzinom und COX-2 Expression

1.6.1 Zusammenhang zwischen Kolonkarzinogenese und COX-2

Vermutungen über eine mögliche Beteiligung der COX an der Entstehung kolorektaler Karzinome ergaben sich aus der Beobachtung, daß viele maligne Tumore erhöhte Prostaglandinkonzentrationen aufwiesen. Diese konnten in den ersten Studien besonders in Kolonkarzinomen nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang zwischen dem Einfluß der COX und der Kolonkarzinogenese wurde weiterhin auf molekulargenetischer Ebene untersucht. Eine durch chemische Mutagene erzeugte dominante Mutation, Min, wurde auf dem homologen APC-Gen der Maus gefunden und als Ursache für die Polyposis im gastrointestinalen Trakt und andere dortige Läsionen angesehen. Die Anzahl der Polypen in APC-mutierten und heterozygoten COX-2 knockout Mäusen war auf 34% bzw. 14% (homozygot COX-2 knockout) bezogen auf die Kontrollgruppe reduziert. Zusätzlich war die Größe der Polypen signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Somit konnte der Einfluß der COX-2 auf die Bildung der Polypen auch auf genetischer Ebene gezeigt werden [16].

1.6.2 Positive Wirkungen der NSAIDs in der Therapie intestinaler Tumoren

Durch die in mehreren epidemiologischen Studien aufgedeckte Korrelation zwischen einer verringerten Inzidenz von Kolonkarzinomen und der regelmäßigen Einnahme von NSAIDs über einen längeren Zeitraum ergab sich mit der Aussicht auf ein Tumorthapeutikum aus der Gruppe der NSAIDs ein interessanter Forschungsansatz. In den meisten Studien konnte eine dosis- und/oder dauerabhängige Reduktion des Risikos der Entwicklung eines Kolonkarzinoms gezeigt werden. Ausgehend von diesem folgten gezielte Untersuchungen hinsichtlich einer erhöhten COX-2 Expression in verschiedenen malignen Tumoren.

Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), als Präkanzerose des kolorektalen Karzinoms, ist charakterisiert durch multiple adenomatöse Polypenbildung im Kolon und Rektum. Der günstige Einfluß von NSAIDs auf Reduktion der Tumoren in Größe und Anzahl wurde auch an FAP Patienten festgestellt. So konnten Phillips et al. [19] in

einer randomisierten, doppelblinden, Placebo kontrollierten Studie an 83 Patienten mit FAP eine signifikante ($p=0,033$) Reduktion der duodenalen Polypen unter der Einnahme vom selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib (400 mg/2mal pro Tag über 6 Monate) im Vergleich zur Placebogruppe aufzeigen.

1.7 Protektive Effekte der NSAIDs in der Prävention des Mammakarzinoms

Epidemiologische Studien bezüglich des Mammakarzinoms zeigten unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika und der Inzidenz dieses Karzinoms. Die Ursache hierfür könnte in einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der einzelnen Medikamente im drüsigen Gewebe der Mamma liegen. Weiterhin könnte eine erhöhte Expression der Cyclooxygenase-2 auf einen bestimmten Subtyp des Mammakarzinoms beschränkt sein [15].

Khuder et al. [20] erstellten eine Metaanalyse aus 6 Kohorten- und 8 Fall-Kontroll-Studien. Das kombinierte geschätzte relative Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms betrug 0,82 {95% CI = 0,75-0,89}. Es beinhaltete das RR der Kohortenstudien von 0,78 {95% CI = 0,62-0,99} sowie das RR der Fall-Kontroll-Studien von 0,87 {95% CI = 0,84-0,91}. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, daß die Einnahme von NSAIDs mit einem verringerten Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms assoziiert ist.

Die folgende Abbildung gibt einen grafischen Überblick der Metaanalyse.

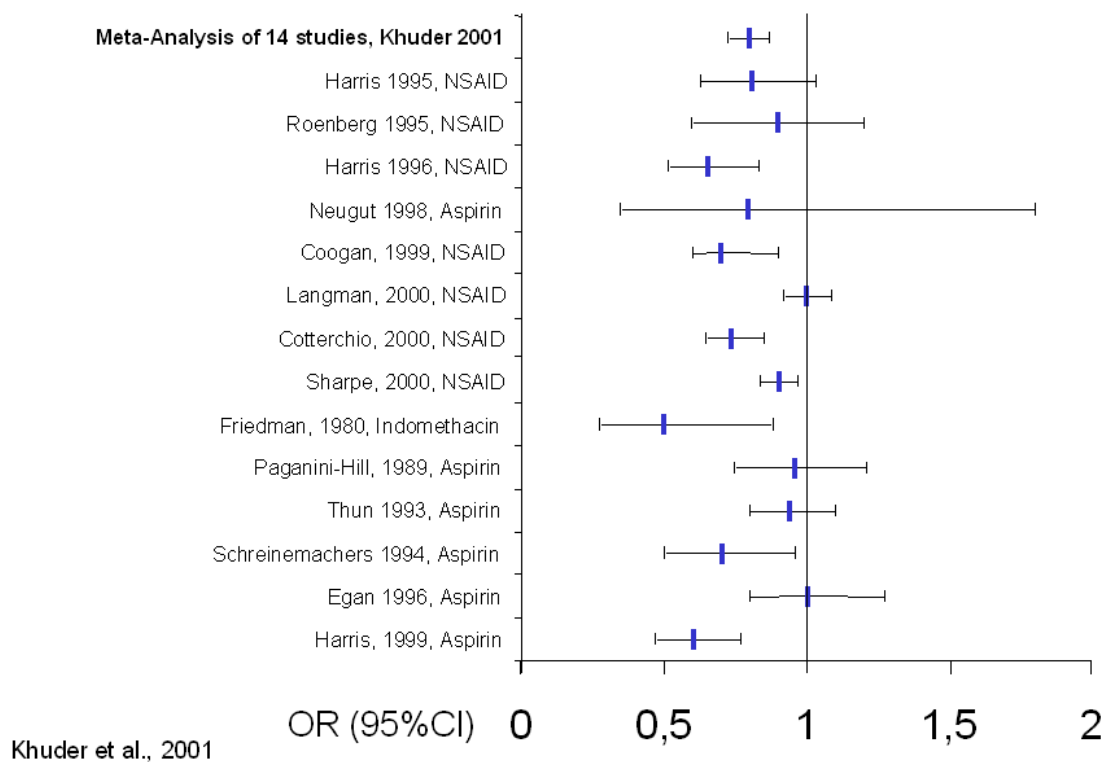


Abb. 2: Reduktion des Mammakarzinomrisikos unter Einnahme von NSAIDs

Johnson TW et al. [21] zeigten in einer prospektiven Kohorte von postmenopausalen Frauen ($n = 27.616$) über 6 Jahre Nachbeobachtungszeit bei Einnahme von Aspirin oder anderen NSAIDs ebenso eine Reduktion der Entwicklung eines Mammakarzinoms ($RR = 0,80$; $95\% \text{ CI} = 0,67 - 0,95$).

1.8 Zielstellung

Die folgenden Fragen sollten mit dieser immunhistologischen Studie geklärt werden:

1. Wie ist die Expression der COX-1 und –2 im nicht malignen Mammagewebe?
2. Wie ist die Expression der COX-1 und –2 im Mammakarzinom?
3. Besteht eine Korrelation zwischen dem Expressionsmuster und ausgewählten Tumorparametern?
4. Welche prognostische Relevanz haben beide Isoenzyme?
5. Welche Expression der Cyclooxygenasen zeigen Mammakarzinomzellen in vitro?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die immunhistochemische Analyse wurde retrospektiv an Tumormaterial der Routinediagnostik erstellt, für die das Einverständnis der Patientinnen für wissenschaftliche Nutzung des Restgewebes vorlag. Die Gewebeproben der dem Kollektiv zugrundeliegenden Patientinnen mit der Diagnose eines primären Mammakarzinoms zwischen Juni 1991 und Juni 1996 entstammen dem Archiv des Institutes für Pathologie der Charité Berlin. Fälle mit Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt, bilaterale Karzinome oder ausschließlich nicht-invasive Karzinome wurden ausgeschlossen. Alle Patientinnen mit Wohnsitz in und außerhalb Berlins (221 Patientinnen, 77% der Gewebeproben) wurden in die Studie einbezogen. Die Überlebensdaten wurden unter Einhaltung der Richtlinien des Datenschutzes am örtlichen Landeseinwohneramt erfragt. Die Summe verschiedener postoperativer Therapieverfahren und Kontrolluntersuchungen ergab die Nachbeobachtungszeit. Klinische Daten hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven entstammen den Akten der Tumornachsorge der Charité und waren für 169 der 221 Patientinnen (76%) verfügbar. Das rezidivfreie Überleben wurde definiert als Zeit zwischen der Diagnosestellung und dem Auftreten von lokalen oder fernen Rezidiven, die klinisch oder histologisch diagnostiziert werden konnten. Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeit zwischen der Diagnose und dem Tod.

Das Patientenkollektiv (Tabelle 3) gliedert sich wie folgt auf: Das durchschnittliche Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 60 Jahre (28-88 Jahre). Die Karzinome der vorliegenden Untersuchungsgruppe verteilen sich bezüglich der zugehörigen Histologie wie folgt: 179 (81%) duktale Karzinome, 28 (13%) lobuläre Karzinome, 14 (6%) Fälle anderer Histologie. Somit ist die Zusammensetzung dieses Kollektivs mit der in epidemiologischen Studien erfaßten Aufteilung der histologischen Subtypen (Kapitel 1.1.1) vergleichbar. Von den 221 Patientinnen wurden 164 (74%) von demselben Operateur in der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité Berlin operiert. Informationen über adjuvante Therapien waren für 119 Patientinnen (53%) verfügbar. Von diesen erhielten 50 Frauen (42%) eine Hormontherapie. Zum Vergleich der Cyclooxygenaseexpression im gesunden Gewebe wurden 7 Fälle mit fibrozystischer Mastopathie untersucht, die nicht mit in die

statistische Analyse eingeschlossen wurden.

Tabelle 3: Charakteristik des Patientenkollektivs

Merkmal	Anzahl der Patientinnen	%
Gesamtkollektiv	221	100
histologischer Typ		
duktales Karzinom	179	81,0
lobuläres Karzinom	28	12,7
andere Karzinome	14	6,3
Tumorgroße (mm)		
≤20	142	64,3
>20	79	35,7
Lymphknotenstatus		
pN0	104	47,1
pN1mic	10	4,5
pN1a	43	19,5
pN2a	31	14,0
pN3a	33	14,9
Differenzierungsgrad		
G1	56	25,9
G2	113	52,3
G3	47	21,8
Gefäßinvasion		
nicht erkennbar	183	82,8
positiv	38	17,2
Östrogenrezeptorstatus		
negativ	58	36,7
positiv	100	63,3
c-erbB2 Status		
-	73	48,3
+	35	23,2
++	24	15,9
+++	19	12,6
Tumorproliferation		
MIB-1 <20%	110	77,5
MIB-1 ≥20%	32	22,5
Alter		
<60 Jahre	109	49,3
>60 Jahre	112	50,7

2.2 Material

2.2.1 Zelllinien

MCF7 (ATCC# HTB 22)
Adenokarzinom der Brustdrüse

Cell Lines Service, Heidelberg

SK-BR-3 (ATCC# HTB 30)
Adenokarzinom der Brustdrüse

Cell Lines Service, Heidelberg

2.2.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid

Appligene oncor, Illkirch Graffenstaden, Frankreich

Alkaline phosphatase
conjugated goat anti mouse
antibody, cat #AC 32 ML

Tropix, Bedford, USA

Antibody diluent reagent
solution

Zymed, San Francisco, USA

APS
(Ammoniumperoxiddisulfat)

Merck, Darmstadt

Aquatex

Merck, Darmstadt

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

CDP-Star Ready-to-use

Tropix, Bedford, USA

Coomassie Brilliantblau

Fluka AG, Buchs, Schweiz

COX-2 Blocking peptide,
cat #36017

Cayman, Ann Arbor, USA

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

DTT

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Dulbecco's Modified Eagle's
Medium (DMEM),
cat #BE12-707F

Bio Whittaker, Verviers, Niederlande

Essigsäure	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA
Ethylendiamintetraessigsäure- di-Natriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
Foetales Kälberserum (FCS), cat #3402-P992203	PAN Biotech, Aidenbach
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
I-Block	Tropix, Bedford, USA
Interleukin-1 β (IL-1 β), rekombinant, human, cat #201-LB	R&D Systems, Wiesbaden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Marker für Gele	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Monoklonaler COX-1 Antikörper, cat #160110	Cayman, Ann Arbor, USA
Monoklonaler COX-2 Antikörper, cat #160112	Cayman, Ann Arbor, USA
Ms X Actin	Chemicon International, Temecula, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitro-Block II	Tropix, Bedford, USA

Protein Block serumfrei	DAKO, Carpinteria, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sigma fast: Fast red TRI	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Naphthol AS-MX tablet sets	
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
12-O-Tetradecanoylphorbol- 13-acetate (TPA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

2.2.3 Kits

BCA protein assay kit; cat #23225	Pierce Rockford, Illinois, USA
Super Sensitive Detection Kit	Bio Genex, San Ramon, USA

2.2.4 Lösungen, Kulturmedien

10 x Elektrophorese-

puffer:

30,3	g	Tris-Base
144,0	g	Glycin
2,8	g	SDS
ad 1000,0	ml	H ₂ O

pH 8,3-8,4 einstellen

10 x Transferpuffer:

29,0	g	Glycin
58,0	g	TRIS- Base
3,7	g	SDS
ad 800,0	ml	H ₂ O

pH 8,3 einstellen

Blocking-Puffer:

0,6	g	I-Block
30,0	ml	10 x PBS oder TBS

PBS mit 270,0 ml Aqua Bidest auffüllen,
erhitzen (nicht kochen), abkühlen lassen

300,0	µl	Tween 20
-------	----	----------

Waschpuffer:

100,0	ml	10 x PBS oder TBS
1,0	ml	Tween 20
ad 1000,0	ml	H ₂ O

10 x TRIS-Puffer: 9,0 g Tris-Base
 68,5 g Tris-HCl
 87,8 g NaCl
ad 1000,0 ml H₂O
 pH 7,4 einstellen

Proteinlysispuffer: 1,2 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
 2,0 ml 10% SDS
 1,0 ml Glycerol
 0,5 ml DTT (1M)
 5,3 ml Aqua Bidest

Polyacrylamidgel 10% 2,5 ml Acrylamid
 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
100,0 µl 10% SDS
50,0 µl 10% APS
5,0 µl TEMED
4,8 ml H₂O

Sammelgel 4%

0,5 ml Acrylamid

1,25 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)

50,0 µl 10% SDS

50,0 µl 10% APS

10,0 µl TEMED

3,2 ml H₂O**Coomassie-****Färbelösung**

0,6 g Coomassie-Blau

100,0 ml Essigsäure

ad 1000,0 ml H₂O**Färbefixierlösung für****Coomassie**

250,0 ml Isopropanol

100,0 ml Essigsäure

ad 1000,0 ml H₂O**2.2.5 Verbrauchsmaterial**

Chromatographiepapier

Whatman, Maidstone, England

3MM CHR

Deckgläser

Menzel-Gläser, Braunschweig

24 x 60 mm/ 24 x 40 mm

Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Insulinspritzen 1 ml	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Microtest Zellkulturplatte, 96 well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Objektträger (Super Frost Plus) 25 x 75 x 1,0 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pap Pen	The Binding Site, Birmingham, UK
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Zellkultur	Falcon–Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 / 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Skalpell	Bard-Parker–Becton Dickinson, Hancock, USA
Spritzen 5 / 10 / 20 ml	B. Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon–Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Costar, Corning, USA
Zellstoff	Hartmann, Heidenheim

2.2.6 Geräte

Bio Kinetics Reader EL 340	BIO-TEK Instruments, Winooski, USA
Dampfsterilisator Varioclav	H+P Labortechnik, München
Einzelkochtafel	Rommelsbacher Elektrohausgeräte GmbH, Dinkelsbühl
Elektrophoresekammern Agagel Maxi und Mini	Biometra, Göttingen
Elektrophoresenetzgerät Savant PS250	Savant Instruments, Holbrook, USA
Filmentwickler Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Geldokumentationsanlage	MWG Biotech, Ebersberg
Heizblock 100°C	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik, München
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schnellkochtopf	Steinbach, Kerpen
Schüttelinkubator 3032	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttler	Biometra, Göttingen
Thermocycler Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zellkulturbrutschrank BB 16	Heraeus, Hanau
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg
Zellkulturwerkbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim

2.3 Methoden

2.3.1 Histopathologische Untersuchung

Die Gewebeproben wurden in 4% Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 5 µm dünne Präparate geschnitten. Für die histopathologische Untersuchung wurden die Proben routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Differenzierungsgrad der vorliegenden Mammakarzinome wurde nach dem Bloom-Richardson Grading, modifiziert von Elston und Ellis [22], festgelegt. Bezüglich des Nodalstatus sind im Mittel 18 Lymphknoten beurteilt worden (Range 1-55). Bei den als pN0 diagnostizierten Fällen wurden mindestens 6 Lymphknoten untersucht (Median 17, Range 6-37). Bei 8 Fällen waren weniger als 10 Lymphknoten nachweisbar. Für diese Studie wurde der Nodalstatus nach der 6. TNM-Klassifizierung [23] eingeteilt.

Die folgenden Parameter wurden den pathologischen Diagnosen entnommen: Östrogenrezeptorstatus, c-erbB2 Status sowie MIB1-Index.

Die Gefäßinvasion wurde durch alleinige lichtmikroskopische Untersuchungen beurteilt, in fraglichen Fällen mittels CD34-Darstellung der Gefäßendothelien.

2.3.2 Immunhistochemie

Das Paraffin der Schnitte wurde durch dreimaliges Waschen zu je 5 min in Xylol sowie in absteigender Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70% Ethanol für jeweils 5 min) entfernt. Anschließend sind die Proben in Aqua dest. gewässert worden. Daraufhin wurden sie im leicht sauren Milieu des Citratpuffers erhitzt und 5 min im Schnellkochtopf bei Überdruck gekocht, um die Epitope für den Antikörper besser zugänglich zu machen.

Bis zur Applikation dessen verweilten die Gewebsschnitte in TBS-Pufferlösung.

Bei Anfärbung der COX-1 wurde danach zusätzlich ein Proteinblocker verwendet.

Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C mit dem primären monoklonalen Antikörper in Verdünnung von 1:1000 (COX-2) bzw. 1:200 (COX-1) in der Antikörper-Verdünnungslösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS/Tween erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem Zweitantikörper und der alkalischen Phosphatase des Biotin Streptavidin Amplified Detection Systems für je 20 min bei Raumtemperatur. Die Färbung erfolgte mit Hilfe der naphtholhaltigen Färbetabletten unter jeweiligem Vergleich mit einer Positiv- und Negativkontrolle. Zur Kontrastierung der in einem positiven Fall vorliegenden roten Färbung des Zytoplasmas wurden die Zellkerne zuletzt für ca. 15 sec in Hämalaulösung nach Mayer gegengefärbt und abschließend nochmals gewässert. Am Ende sind die Schnitte mit geringen Mengen Aquatex und entsprechenden Deckgläschen eingedeckt worden.

Die Spezifität des COX-2 Antikörpers wurde durch Verwendung eines COX-2 blocking peptids (Abb. 25) kontrolliert.

2.3.3 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung

Das für die vorliegende Studie verwandte Punktesystem basiert auf der Intensität der Anfärbung multipliziert mit der prozentualen Anzahl positiver Zellen und ergibt einen immunreaktiven Score (IRS) zwischen 0 und 12. Dieses System ist identisch mit dem für die Untersuchung des Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms [24].

Tabelle 4: Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung

Prozentuale Positivität	Punktzahl	Intensität	Punktzahl
keine	0	negativ	0
<10%	1	schwach	1
10-50%	2	mäßig	2
51-80%	3	stark	3
>80%	4		

Bei Betrachtung der univariaten Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier zeigte sich, daß die Graphen der Tumoren mit einem COX-2 IRS von 0-6 sowie mit einem IRS von 7-12 in zwei getrennten Gruppen verliefen. Aus diesem Grund wurde in dieser Einteilung die Trennung zwischen Negativität (IRS 0-6) und Positivität (IRS 7-12) festgelegt, die so für die gesamte Auswertung verwendet wurde. Die Auswertung der COX-1 erfolgte analog, um eine möglichst objektive Vergleichbarkeit zwischen beiden Isoenzymen zu erhalten. Die hier angewandte Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung der Cyclooxygenasen wurde in ähnlicher Art bereits in anderen Studien [25][26][27][28] verwendet.

2.3.4 Angaben zur Statistik

Die Korrelation zwischen der Expression von COX-1 oder COX-2 und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern wurde definitionsgemäß mit Hilfe des zweiseitigen Fisher Tests oder des χ^2 Tests beurteilt. Das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben wurden in der univariaten Überlebensanalyse mittels der Kaplan-Meier Methode berechnet. Da das mittlere Gesamtüberleben nicht in allen Untergruppen erreicht wurde, ist weiterhin die rezidivfreie Überlebensrate innerhalb von 5 Jahren und die gesamte 5-Jahres-Überlebensrate angegeben worden. Der Vergleich verschiedener Überlebenskurven erfolgte mit dem log rank Test. Die multivariate Analyse wurde anhand des Cox proportional hazard regression Models erstellt, in welchem alle in der univariaten Analyse als signifikant mit dem Überleben korrelierenden Variablen berücksichtigt worden sind. In dieser Analyse wurde das Alter der Patientinnen als ein zusätzlicher Parameter einbezogen.

Als signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 betrachtet. Für die statistische Analyse wurde die SPSS Software Version 10.0 verwendet.

2.3.5 Zellkultur

Die humanen Mammakarzinomzelllinien MCF7 und SK-BR-3 wurden in 75 (25) cm²-Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS und 2% L-Glutamin in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen

Volumenanteil CO₂ kultiviert. Sämtliche Versuche wurden innerhalb von 10 Passagen durchgeführt. Die Zellkulturarbeiten liefen unter einer sterilen Werkbank sowie Verwendung steriler Materialien und Lösungen ab. Die Trypsin-Lösung wurde zusätzlich bei der Zugabe filtriert.

Der Austausch des Kulturmediums fand alle 3-4 Tage statt. Bei ca. 80%iger Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert: Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin gespült. Nach erneutem Absaugen wurde 1 ml frisches Trypsin über den gesamten Flaschenboden verteilt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation bei 37°C, bis sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. Von der resultierenden Zellsuspension wurden abhängig der Zelllinie 0,25 ml bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und diese mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

2.3.6 Versuchsanordnung

Die aus der Passagierung zur Verfügung stehende Zellsuspension wurde je nach Bedarf mit Medium verdünnt und gleichmäßig in 40 mm große Petrischalen ausgesät. Nach der Ergänzung von Medium auf ein Volumen von jeweils 4 ml folgte die Inkubation im Brutschrank für 2-3 Tage. Nach dem Erreichen von mind. 70%iger Konfluenz wurde das Medium durch 4 ml serumfreies Medium ausgetauscht.

Am folgenden Tag erfolgte die Stimulation mit 10ng/ml IL-1 β bzw. TPA. Hierbei wurde pro Versuchsreihe eine bis auf diese Zugabe gleich behandelte Kontrolle mitgeführt.

2.3.7 Proteinisolierung

Zu Beginn wurden je 2 ml Medium der Petrischalen abgenommen und 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Von den dabei anfallenden Überständen sind danach je 1 ml für weitere Versuche in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C tiefgefroren worden. Im Anschluß daran sind die Schalen mit je 1 ml PBS gespült worden. Als nächstes wurden die subkonfluenten Zelllinien auf Eis mit je 100 μ l Proteinlysispuffer lysiert.

Das Lysat wurde durch mehrmaliges Aufziehen in eine Insulinspritze mechanisch degradiert und bei -20°C gelagert.

2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des BCA-Kit nach Pierce durchgeführt. In diesem wird Cu^{2+} durch die Proteine reduziert, die reduzierten Cu^{+} -Ionen bilden anschließend mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex. Die als Maß des Reaktionsumfanges entstehende Farbintensität wird in einem ELISA-Reader bei 562 nm gemessen. Das Procedere erfolgte nach Anweisungen des Herstellers, wobei die Proben 1 h inkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine Protein-Standardreihe unter gleichen Versuchsbedingungen mitgeführt, mit dessen Hilfe die Proteinkonzentrationen berechnet werden konnten.

2.3.9 Western Blot

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Lysepuffer auf 20 μl aufgefüllt und für 10 min der heißen Lyse bei 95°C unterzogen.

Daran schloß die Auftrennung der Proben und eines Längenmarkers in einem 10% Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE bei 100 V für 2 Stunden an. Daraufhin wurden die Proteine in einem Semi-Dry-System mit einer Stromstärke von 100 mA für 90 min auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Im folgenden sind unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation der Membran im Blockingpuffer für 30 min bei Raumtemperatur blockiert worden.

Die monoklonalen Primärantikörper banden, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 im Blockingpuffer, über Nacht bei 4°C an die Proteine. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem sekundären goat-anti-mouse Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, in einer Verdünnung von 1:5000 im Blockingpuffer für 45 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreifachen Waschen im Waschpuffer und 4minütigem Waschen in Assaypuffer reagierte das hinzugefügte CDP-Star RTU Lumineszenzsystem für 5 min mit den gebundenen Antikörpern und ein Hyperfilm konnte belichtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von COX-2 und COX-1 im Normalgewebe

Die in den Tumorproben untersuchten Stromazellen und Kapillaren wiesen keine deutliche Expression der COX-2 auf.

Eine erhöhte Expression dieses Enzyms wurde in einigen Fällen in morphologisch nicht alteriertem Brustdrüsengewebe in der Umgebung invasiver Karzinome gefunden.

Zur Feststellung des Expressionsmusters im benignen Gewebe (Abb. 23) wurden 7 Proben mit fibrozystischer Mastopathie untersucht. Die COX-2 konnte in keinem dieser Fälle nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu wiesen die untersuchten Mastopathien in 4 von 7 Proben eine positive Expression der Cyclooxygenase-1 auf.

3.2 Expression von COX-2 und COX-1 im Mammakarzinom

Eine deutliche COX-2 Expression (IRS 7-12) konnte in 36% der 221 untersuchten Mammakarzinome als perinukleäre, granuläre Reaktivität festgestellt werden (Abb. 24, Abb. 28, Abb. 29).

Im Gegensatz zur COX-2 wies die COX-1 immunhistochemisch ein cytoplasmatisch betontes Expressionsmuster auf (Abb. 27). Eine eindeutige Expression konnte in diesem Fall bei 45% der 218 untersuchten Proben festgestellt werden.

Eine Positivität für beide Isoformen der Cyclooxygenase zeigten 43 Tumoren (19,7%).

Tabelle 5: Expression der Cyclooxygenasen im Patientenkollektiv

Merkmal	Anzahl der Patientinnen	%
Gesamtkollektiv	221	100
COX-2 Expression		
negativ (IRS 0-6)	141	63,8
positiv (IRS 7-12)	80	36,2
COX-1 Expression		
negativ (IRS 0-6)	119	54,6
positiv (IRS 7-12)	99	45,4

3.3 Korrelation der COX mit klinisch-pathologischen Parametern

Die immunhistochemische Analyse der COX-1 und COX-2 im Mammakarzinom ergab ein unterschiedliches Expressionsmuster beider Isoenzyme in Korrelation mit mehreren klinisch-pathologischen Parametern. So konnten, wie im folgenden aufgezählt, signifikant positive Korrelationen (*) zwischen einer erhöhten COX-2 Expression (Tabelle 6) mit verschiedenen prognostisch ungünstigen Parametern festgestellt werden. Die COX-1 korrelierte hingegen mit zwei dieser klinisch-pathologischen Parameter signifikant negativ (Tabelle 7).

3.3.1 Korrelation der COX-2 mit klinisch-pathologischen Parametern

Es exprimierten 41% der invasiv-duktaalen Karzinome, 14% der lobulären und 21% der anderen Karzinome die COX-2 (Abb. 5). Invasiv-duktaale Karzinome zeigen signifikant häufiger eine deutliche Expression der COX-2 als andere histologische Typen.

Eine vermehrte COX-2 Expression korrelierte signifikant mit einer Tumorgroße >20 mm (58% der Fälle COX-2 positiv). Tumore ≤20 mm exprimierten in 76% dieses Isoenzym dagegen nicht (Abb. 6).

Weiterhin ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Metastasierung in regionäre Lymphknoten und einer positiven COX-2 Expression. Nur 16,3% der nodal negativen Tumoren waren COX-2 positiv, jedoch 57,6% der pN3a-Tumore (Abb. 7). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Stichprobengröße innerhalb der einzelnen Untergruppen (Tabelle 3) korrelierte eine erhöhte COX-2 Expression mit zunehmender Lymphknotenmetastasierung.

Ferner wurde die Beziehung zwischen der histologischen Differenzierung und der COX-2 Expression untersucht. Auch hier ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen einer geringen bis fehlenden Zelldifferenzierung und einer hohen Expression der COX-2 (Abb. 8). Von den Tumoren im G1-Stadium zeigten nur 10,7% eine positive Expression, dagegen waren es bei den G3-Tumoren 61,7%.

Eine erhöhte COX-2 Expression war signifikant mit einer positiven Gefäßinvasion (57,9%) korreliert. Dagegen waren die Tumore mit einer nicht erkennbaren Gefäßinvasion in der Mehrzahl COX-2 negativ (68,3%) (Abb. 9).

Als ein weiterer signifikant mit einer erhöhten COX-2 Expression korrelierender klinisch-pathologischer Tumorparameter konnte der Östrogenrezeptorstatus identifiziert werden. Bei diesem wurde ein Zusammenhang zwischen einer positiven COX-2 Expression mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus sowie andererseits eine Korrelation einer negativen COX-2 Expression mit einer Positivität dieses Rezeptors sichtbar (Abb. 10).

Die im folgenden genannten Parameter wiesen keine signifikant nachweisbaren Korrelationen auf: c-erbB2 Status ($p=0,60$; *Chi² Test*), Tumorphilierung ($p=1,00$; *Fisher Test*), Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ($p=0,21$; *Fisher Test*).

Tabelle 6a: Korrelation der COX-2 Expression mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern

Merkmal	Fallzahl	COX-2 negativ (IRS 0-6)	COX-2 positiv (IRS 7-12)	p-Wert <i>* Chi² Test, † Fisher Test</i>
histologischer Typ				0,012 [*]
duktales Karzinom	179 (100%)	106 (59,2%)	73 (40,8%)	
lobuläres Karzinom	28 (100%)	24 (85,7%)	4 (14,3%)	
andere Karzinome	14 (100%)	11 (78,6%)	3 (21,4%)	
Tumorgroße (mm)				<0,0005 [†]
≤20	142 (100%)	108 (76,1%)	34 (23,9%)	
>20	79 (100%)	33 (41,8%)	46 (58,2%)	
Lymphknotenstatus				<0,0005 [*]
pN0	104 (100%)	87 (83,7%)	17 (16,3%)	
pN1mic	10 (100%)	4 (40,0%)	6 (60,0%)	
pN1a	43 (100%)	21 (48,8%)	22 (51,2%)	
pN2a	31 (100%)	15 (48,4%)	16 (51,6%)	
pN3a	33 (100%)	14 (42,4%)	19 (57,6%)	
Differenzierungsgrad				<0,0005 [*]
G1	56 (100%)	50 (89,3%)	6 (10,7%)	
G2	113 (100%)	70 (61,9%)	43 (38,1%)	
G3	47 (100%)	18 (38,3%)	29 (61,7%)	
Gefäßinvasion				0,03 [†]
nicht erkennbar	183 (100%)	125 (68,3%)	58 (31,7%)	
positiv	38 (100%)	16 (42,1%)	22 (57,9%)	
Östrogenrezeptorstatus				0,04 [†]
negativ	58 (100%)	31 (53,4%)	27 (46,6%)	
positiv	100 (100%)	71 (71,0%)	29 (29,0%)	
c-erbB2 Status				0,60 [*]
-	73 (100%)	45 (61,6%)	28 (38,4%)	
+	35 (100%)	23 (65,7%)	12 (34,3%)	
++	24 (100%)	15 (62,5%)	9 (37,5%)	
+++	19 (100%)	9 (47,4%)	10 (52,6%)	
Tumorproliferation				1,00 [†]
MIB-1 <20%	110 (100%)	75 (68,2%)	35 (31,8%)	
MIB-1 ≥20%	32 (100%)	22 (68,8%)	10 (31,3%)	

Tabelle 6b: Korrelation der COX-2 Expression mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern

Merkmal	Fallzahl	COX-2 negativ (IRS 0-6)	COX-2 positiv (IRS 7-12)	p-Wert <i>* Chi² Test, † Fisher Test</i>
Alter				0,21 [†]
<60 Jahre	109 (100%)	65 (59,6%)	44 (40,4%)	
>60 Jahre	112 (100%)	76 (67,9%)	36 (32,1%)	

3.3.2 Korrelation der COX-1 mit klinisch-pathologischen Parametern

Da COX-1 und COX-2 ähnliche Funktionen haben, sind die im folgenden dargestellten Ergebnisse zur Gegenüberstellung beider Enzyme innerhalb ihrer jeweiligen Rolle im Mammakarzinom besonders interessant.

Zur Untersuchung der Rolle der COX-1 wurden auch bei diesem Isoenzym Korrelationen mit den o.g. klinisch-pathologischen Parametern aufgestellt. Es konnten bei zwei Parametern signifikant negative Korrelationen festgestellt werden (Tabelle 7).

Bezüglich der Tumorgröße korreliert eine positive COX-1 Expression signifikant mit einer Tumorgröße ≤ 20 mm. Tumore mit einem Durchmesser > 20 mm sind dagegen zum größten Teil (65,8%) COX-1 negativ (Abb. 11).

Weiterhin wurde eine Signifikanz zwischen einer positiven COX-1 Expression und einer fehlenden Lymphknotenmetastasierung festgestellt. Es liegt somit eine inverse Korrelation vor. Beachtet man auch hier wieder den jeweiligen Stichprobenumfang (Tabelle 3), so wird deutlich, daß die Anzahl der COX-1 positiven Proben am größten in den nicht metastasierten regionären Lymphknoten ist (pN0: 56,9%) und mit zunehmender Tumorabsiedelung in die Lymphknoten abnimmt (Abb. 12).

Die restlichen in der Studie untersuchten Parameter (Differenzierungsgrad, histologischer Typ, Gefäßinvasion, Östrogenrezeptorstatus, c-erbB2 Status, Tumorproliferation, Alter zum Diagnosezeitpunkt) zeigten keine signifikanten Zusammenhänge mit der COX-1 Expression.

Tabelle 7: Korrelation der COX-1 Expression mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern

Merkmal	Fallzahl	COX-1 negativ (IRS 0-6)	COX-1 positiv (IRS 7-12)	p-Wert * <i>Chi² Test</i> † <i>Fisher Test</i>
Tumorgröße (mm)				0,02 [†]
≤20	139 (100%)	67 (48,2%)	72 (51,8%)	
>20	79 (100%)	52 (65,8%)	27 (34,2%)	
Lymphknotenstatus				0,01 [*]
pN0	102 (100%)	44 (43,1%)	58 (56,9%)	
pN1mic	10 (100%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
pN1a	42 (100%)	23 (54,8%)	19 (45,2%)	
pN2a	31 (100%)	22 (71,0%)	9 (29,0%)	
pN3a	33 (100%)	22 (66,7%)	11 (33,3%)	
Differenzierungsgrad				0,93 [*]
G1	56 (100%)	31 (55,4%)	25 (44,6%)	
G2	110 (100%)	58 (52,7%)	52 (47,3%)	
G3	47 (100%)	26 (55,3%)	21 (44,7%)	

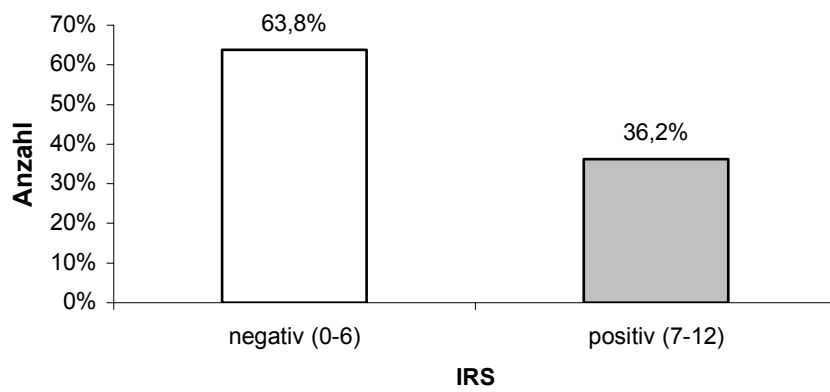


Abb. 3: Expression der COX-2 in 221 Tumorproben

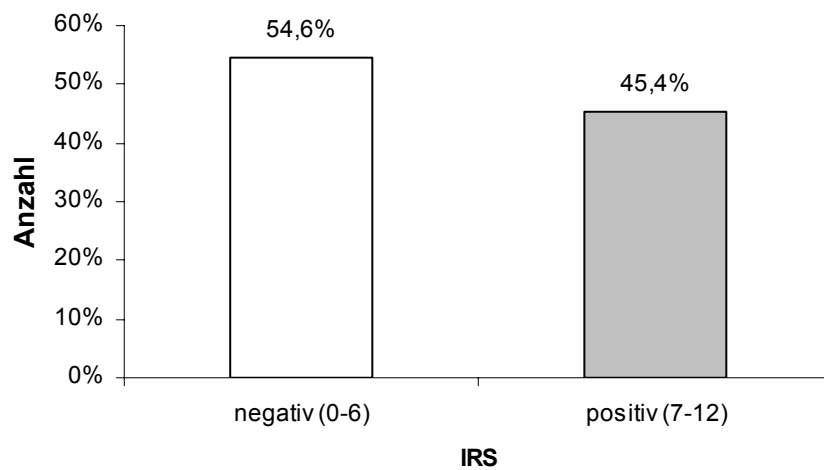


Abb. 4: Expression der COX-1 in 218 Tumorproben

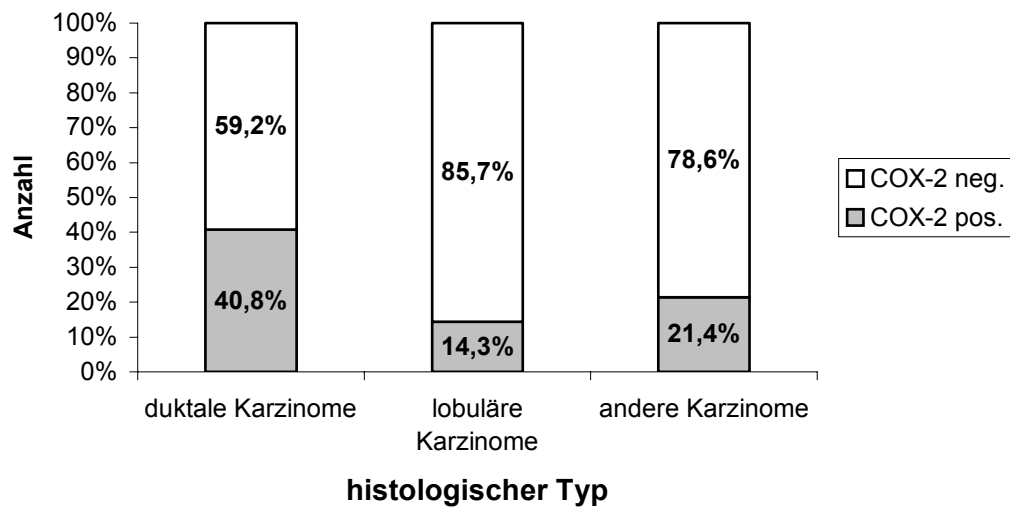


Abb. 5: Korrelation der COX-2 Expression mit verschiedenen histologischen Typen des Mammakarzinoms; $p=0,012$ (χ^2 Test)

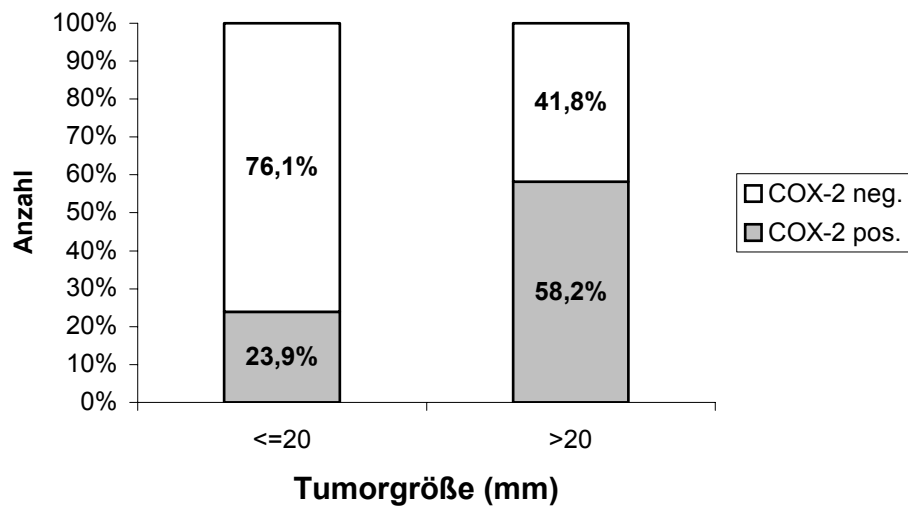


Abb. 6: Korrelation der COX-2 Expression mit der Tumorgroße; $p<0,0005$ (Fisher Test)

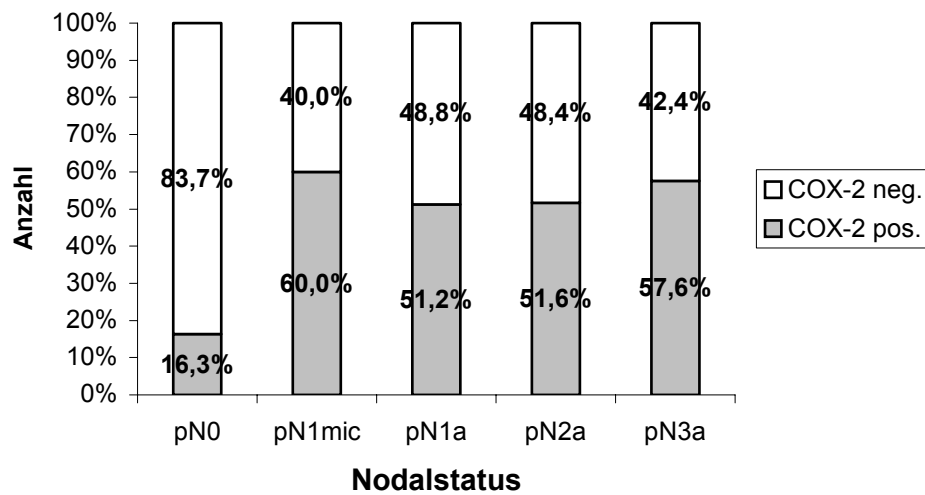


Abb. 7: Korrelation der COX-2 Expression mit dem Lymphknotenstatus; $p < 0,0005$ (χ^2 Test)

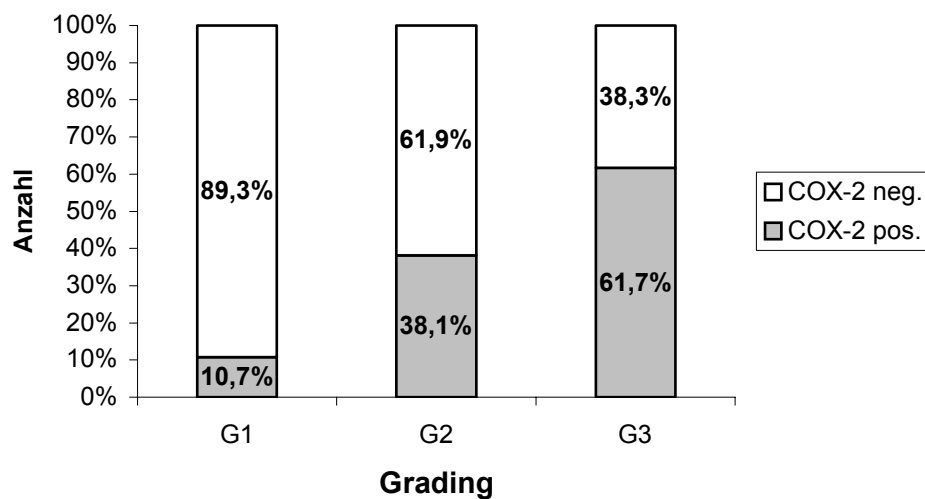


Abb. 8: Korrelation der COX-2 Expression mit dem Grading; $p < 0,0005$ (χ^2 Test)

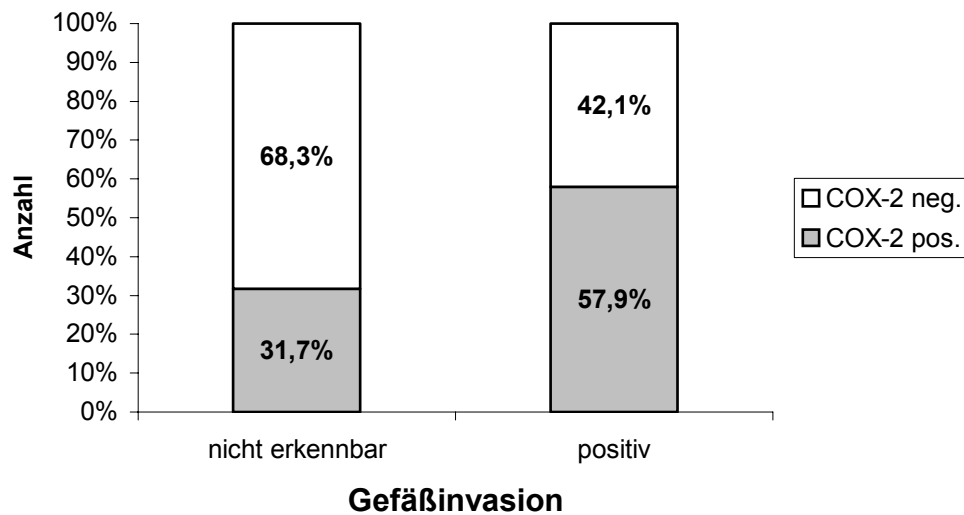


Abb. 9: Korrelation der COX-2 Expression mit der Gefäßinvasion; $p=0,03$
(Fisher Test)

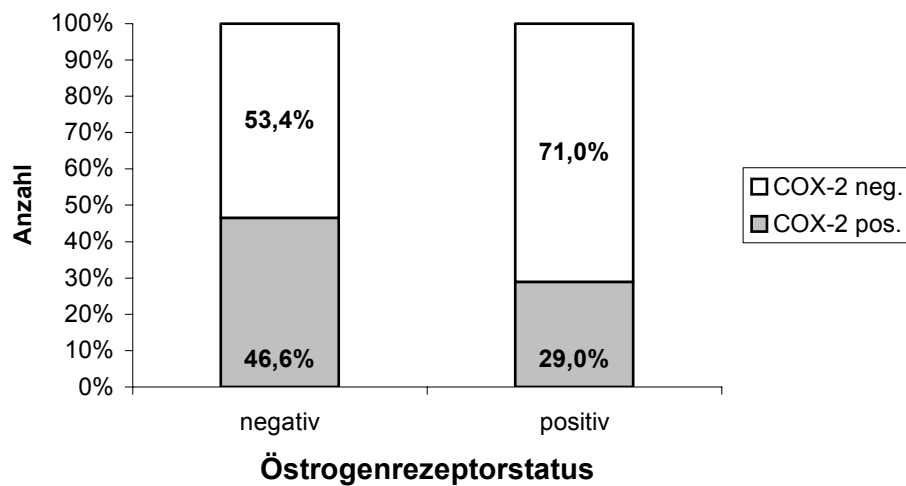


Abb. 10: Korrelation der COX-2 Expression mit dem Östrogenrezeptorstatus; $p=0,04$
(Fisher Test)

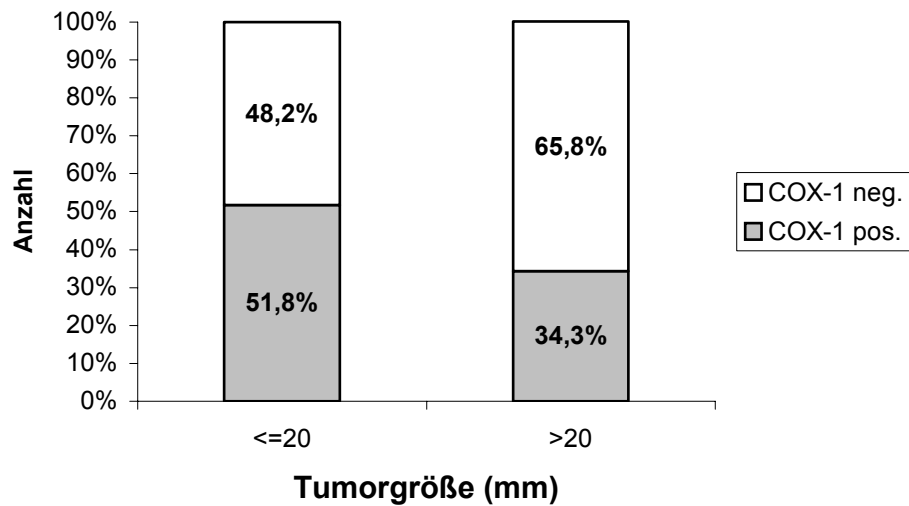


Abb. 11: Korrelation der COX-1 Expression mit der Tumorgröße; $p=0,02$ (Fisher Test)

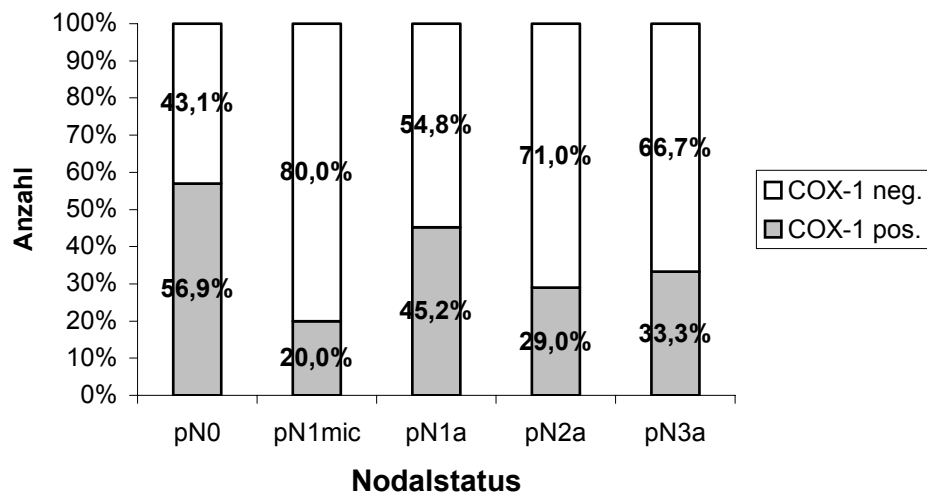


Abb. 12: Korrelation der COX-1 Expression mit dem Lymphknotenstatus; $p=0,01$ (χ^2 Test)

3.4 Univariate Überlebensanalyse

Von allen Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Analyse noch am Leben waren, betrug die Nachbeobachtungszeit im Durchschnitt 87 Monate (2-132 Monate). Während dieser Zeit verstarben 67 Patientinnen (30%).

Bei 48 der 169 Patientinnen (28%) traten in der Nachbeobachtungszeit Rezidive auf. Die mittlere Nachbeobachtungszeit der Frauen ohne Rezidiv betrug 60 Monate (1-120 Monate).

Alle Daten sind zusammenfassend in Tabelle 8 dargestellt.

3.4.1 Prognoserelevante klinisch-pathologische Parameter

Die folgenden Abbildungen stellen die für das rezidivfreie und Gesamtüberleben relevanten signifikanten Parameter dar. Darüber hinaus erreichten sowohl im rezidivfreien, als auch im Gesamtüberleben die Tumorgroße >20 mm ($p=0,0063$ bzw. $p<0,0005$) sowie die Stadien pT2-4 ($p=0,0234$ bzw. $p=0,0001$) statistische Signifikanz. Die Gefäßinvasion ($p=0,03$) erwies sich ebenso wie die Tumorpherifation ($p=0,0007$) nur im rezidivfreien Überleben als signifikant.

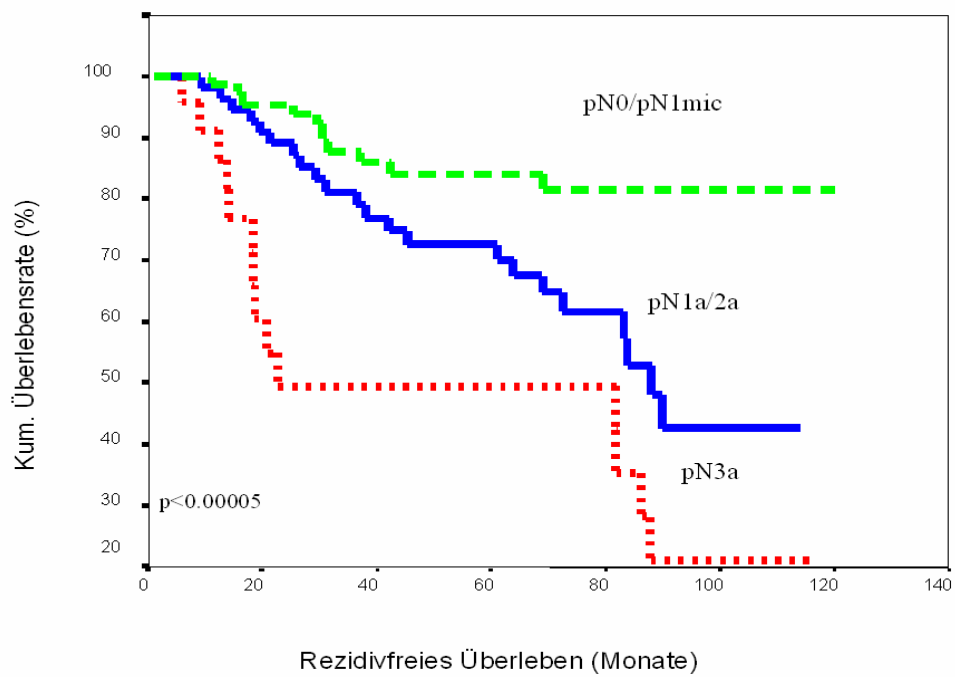


Abb. 13: Einfluß der Lymphknotenmetastasierung auf das rezidivfreie Überleben

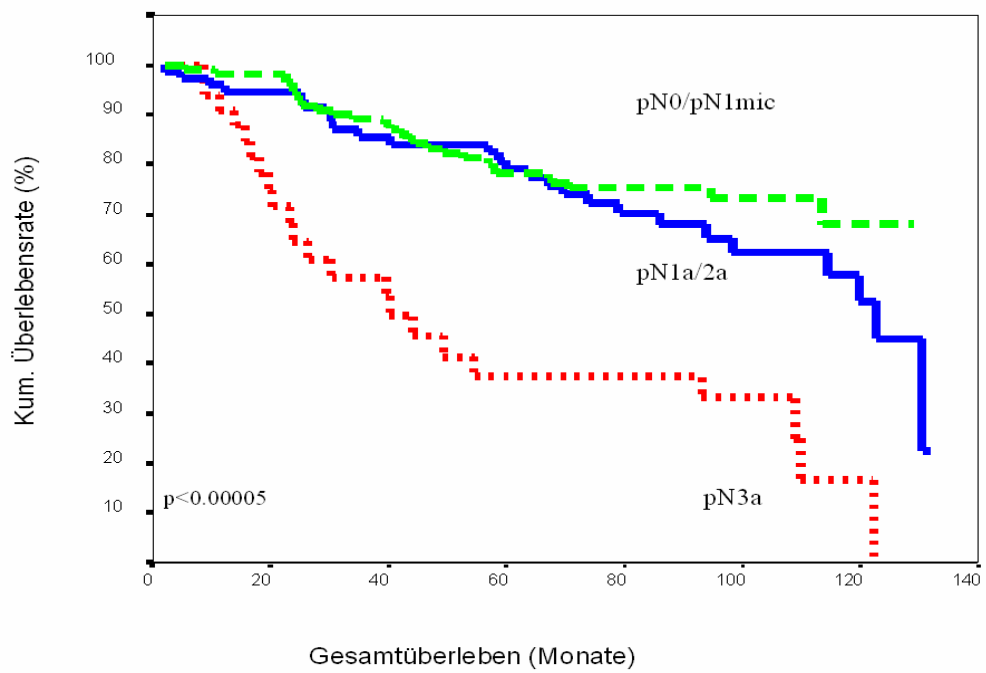


Abb. 14: Einfluß der Lymphknotenmetastasierung auf das Gesamtüberleben

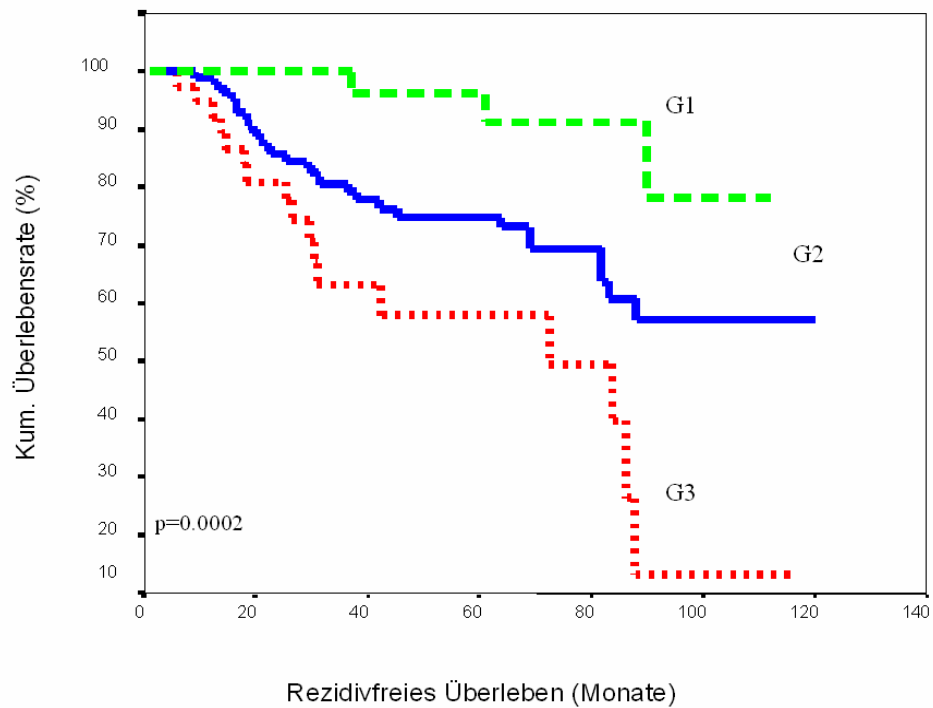


Abb. 15: Einfluß der histologischen Entdifferenzierung auf das rezidivfreie Überleben

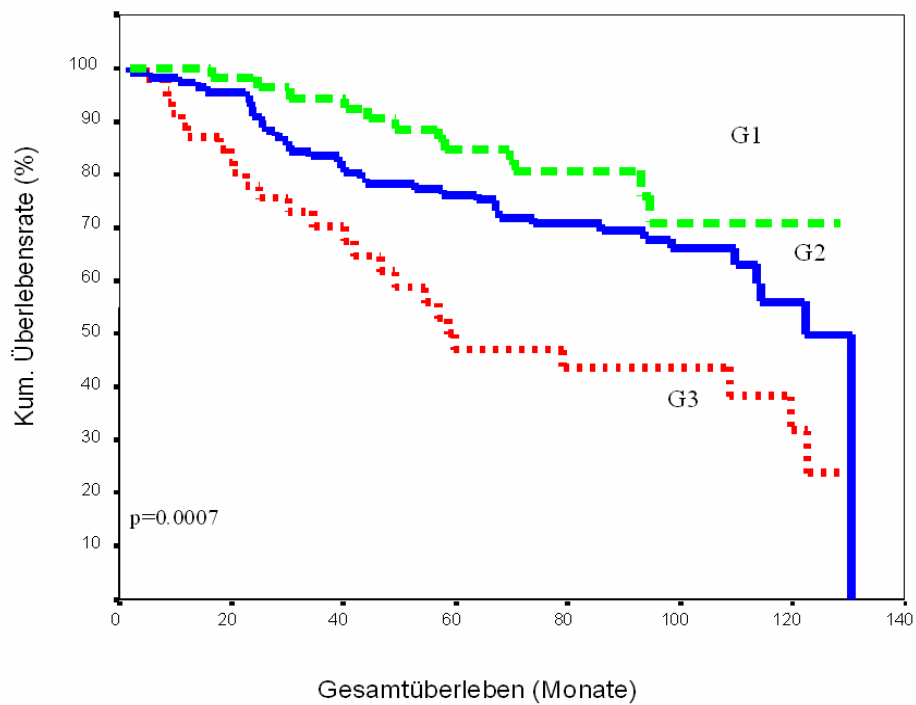


Abb. 16: Einfluß der histologischen Entdifferenzierung auf das Gesamtüberleben

3.4.2 Prognostische Bedeutung der COX-2 Expression

Die univariate Überlebensanalyse zeigte eine signifikante Korrelation zwischen einer positiven COX-2 Expression und einem verminderten rezidivfreien Überleben ($p=0,0007$).

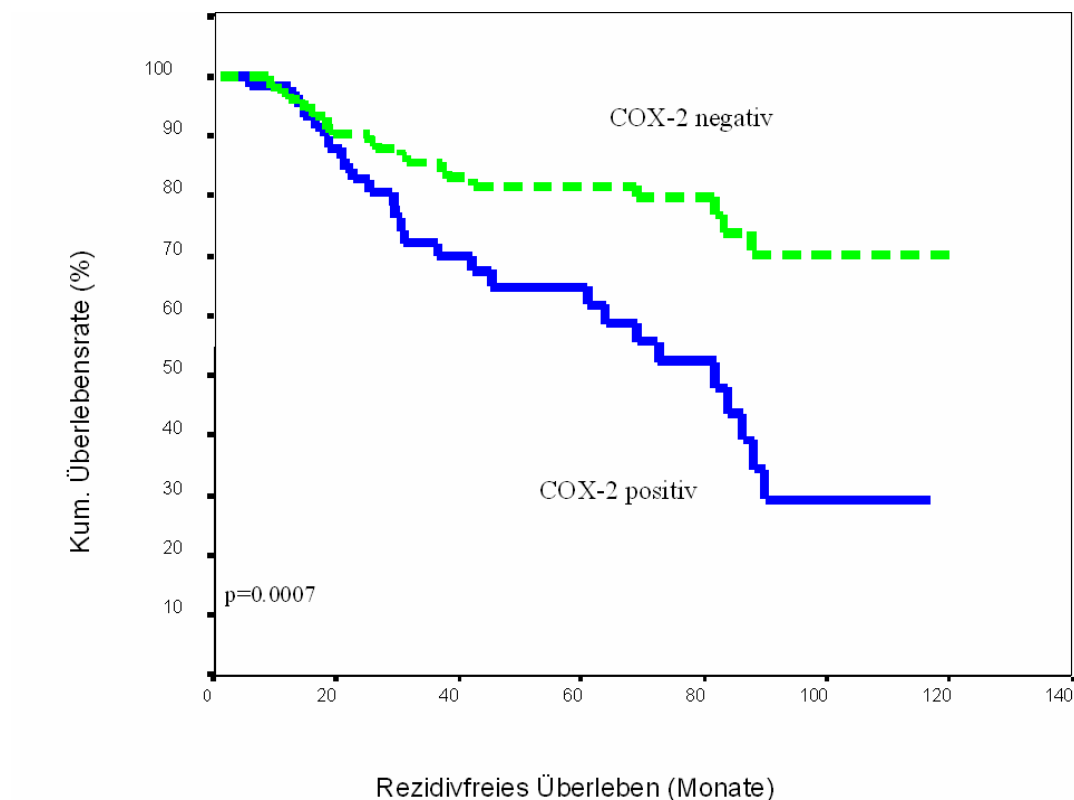


Abb. 17: Einfluß der COX-2 Expression auf das rezidivfreie Überleben

Während die 5-Jahres-Überlebensrate im rezidivfreien Überleben bei Patientinnen mit COX-2 negativen Tumoren 82% betrug, war sie in der Gruppe der COX-2 positiven Tumoren auf 65% reduziert.

Ähnliche Unterschiede fanden sich beim Einfluß der COX-2 Expression auf das Gesamtüberleben. Auch hier korrelierte eine positive COX-2 Expression signifikant ($p=0,02$) mit einem verminderten Überleben innerhalb des dafür definierten Zeitraumes.

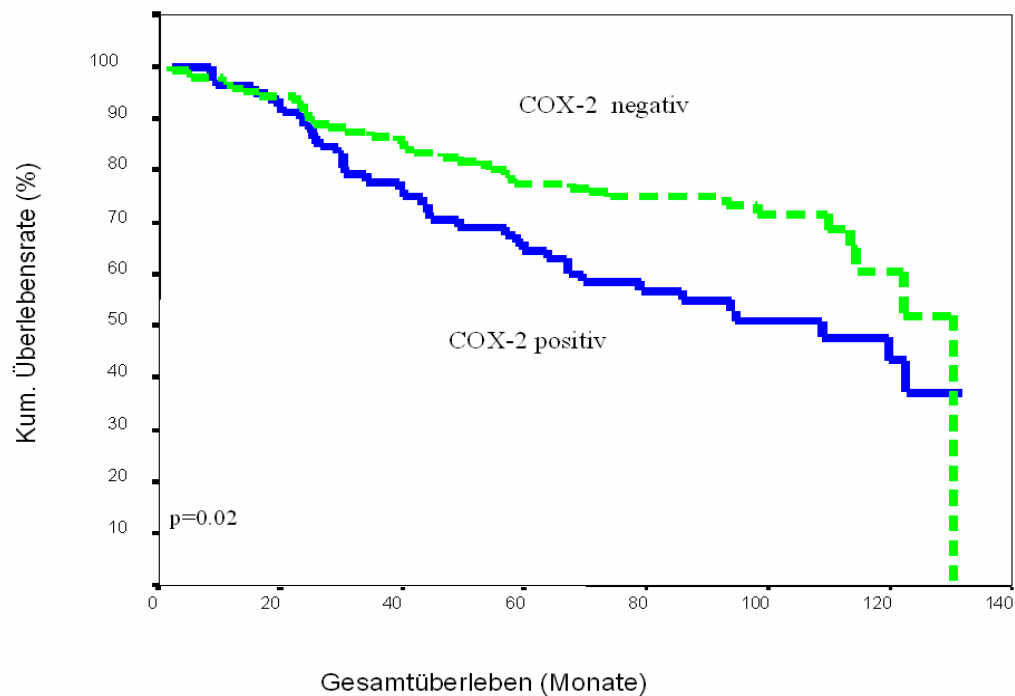


Abb. 18: Einfluß der COX-2 auf das Gesamtüberleben

Die 5-Jahres-Überlebensrate im Gesamtüberleben bei Patientinnen mit COX-2 negativen Tumoren betrug 78%. Im Gegensatz dazu ist sie bei der Gruppe der COX-2 positiven Patientinnen auf 65% gefallen.

Eine positive COX-2 Expression erwies sich auch innerhalb einer Subgruppe ($n=50$), welche adjuvant mit Tamoxifen therapiert worden ist, als signifikanter Prognoseparameter bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,04$).

3.4.3 Prognostische Bedeutung der COX-1 Expression

Zwischen der COX-1 Expression und dem rezidivfreien Überleben ($p=0,88$) sowie dem Gesamtüberleben ($p=0,53$) konnten keine signifikanten Zusammenhänge erkannt werden (Abb. 19, Abb. 20).

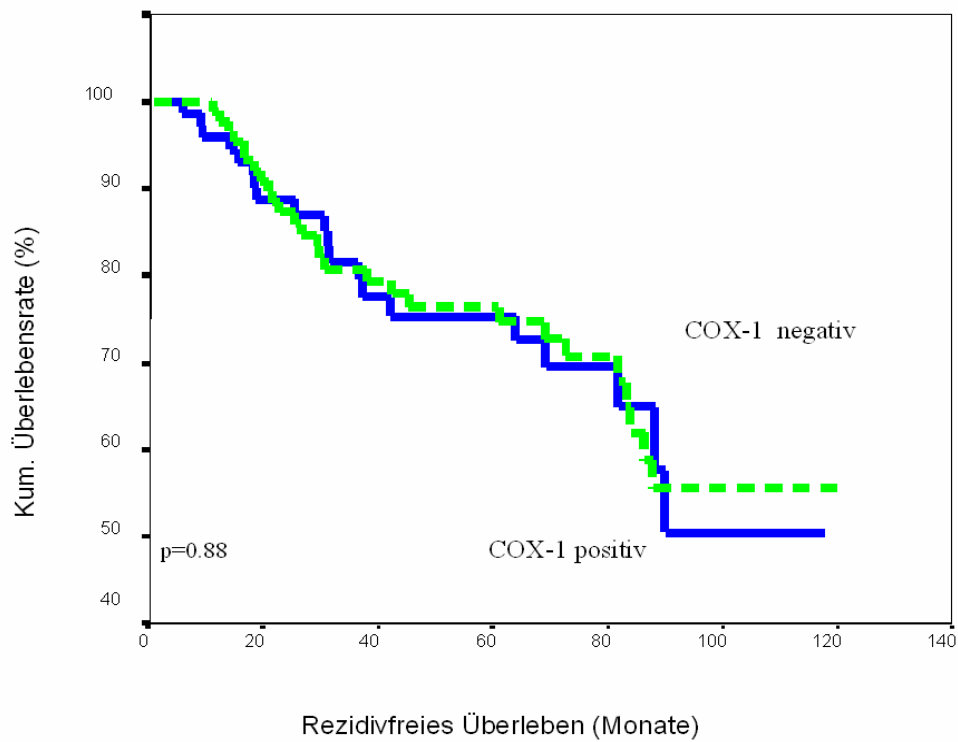


Abb. 19: Einfluß der COX-1 Expression auf das rezidivfreie Überleben

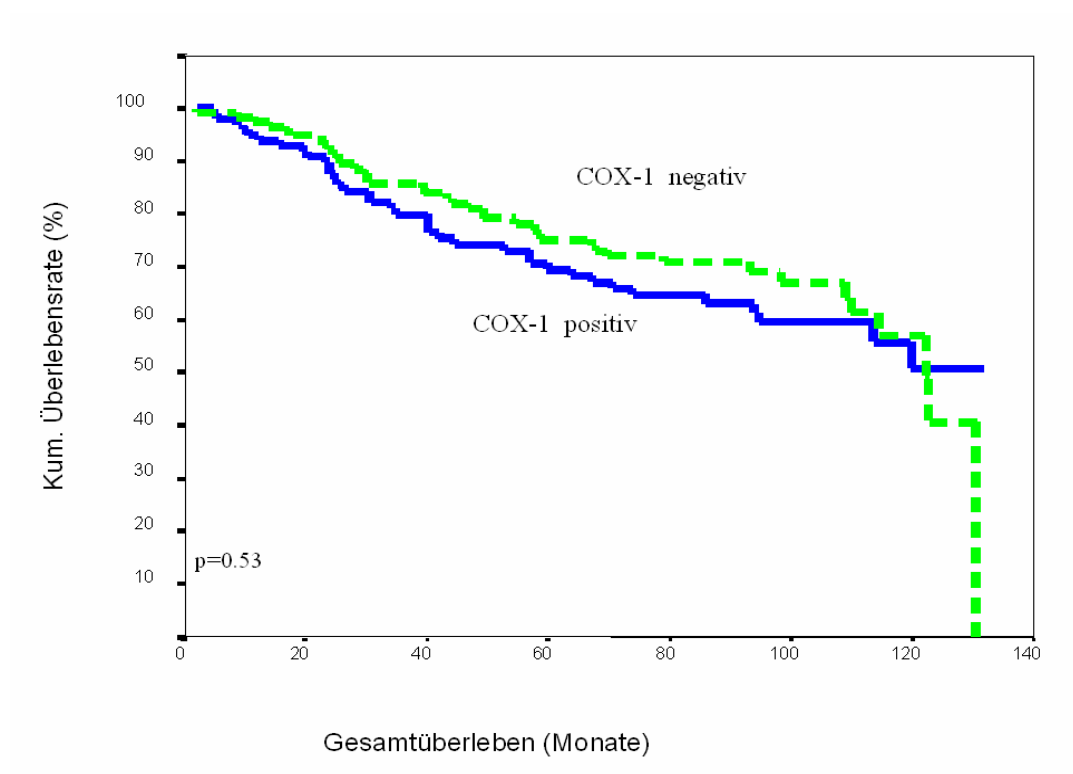


Abb. 20: Einfluß der COX-1 auf das Gesamtüberleben

Tabelle 8a: Univariate Überlebensanalyse (Kaplan-Meier): Mittleres rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bezogen auf klinisch-pathologische Faktoren und COX-1 oder COX-2 Expression

Merkmal	rezidivfreies Überleben				Gesamtüberleben			
	Fallzahl	Ereignisse	5-Jahres-Überlebensrate (% ± SE)	Log rank	Fallzahl	Ereignisse	5-Jahres-Überlebensrate (% ± SE)	Log rank
COX-2 Expression				0,0007				0,02
negativ	107	21	81,7 ± 4,1		141	39	77,5 ± 3,7	
positiv	62	27	64,9 ± 6,9		80	37	64,5 ± 5,6	
COX-1 Expression				0,88				0,53
negativ	93	27	76,4 ± 4,8		119	39	75,1 ± 4,2	
positiv	74	20	75,3 ± 5,7		99	37	69,5 ± 4,8	
histologischer Typ				0,29				0,45
duktales Karzinom								
lobuläres Karzinom	137	43	73,6 ± 4,1		179	66	70,3 ± 3,6	
andere Karzinome	23	4	84,4 ± 8,4		28	7	84,2 ± 7,2	
	9	1	88,9 ± 10,5		14	3	84,6 ± 10,0	
Tumorgroße (mm)				0,006				<0,00005
≤20	107	23	80,3 ± 4,2		142	35	79,0 ± 3,6	
>20	62	25	67,3 ± 6,6		79	41	64,1 ± 5,8	
Lymphknotenstatus				<0,00005				<0,00005
pN0 oder pN1mic	86	12	84,1 ± 4,5		114	28	78,2 ± 4,0	
pN1a oder pN2a	58	22	72,7 ± 6,3		74	26	78,2 ± 4,0	
pN3a	25	14	49,4 ± 11,4		33	22	37,3 ± 9,4	

Tabelle 8b: Univariate Überlebensanalyse (Kaplan-Meier): Mittleres rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bezogen auf klinisch-pathologische Faktoren und COX-1 oder COX-2 Expression

rezidivfreies Überleben					Gesamtüberleben			
Merkmal	Fallzahl	Ereignisse	5-Jahres-Überlebensrate (% ± SE)	Log rank	Fallzahl	Ereignisse	5-Jahres-Überlebensrate (% ± SE)	Log rank
Differenzierungsgrad				0,0002				0,0007
G1	39	3	96,1 ± 3,7		56	12	84,6 ± 5,0	
G2	89	27	74,8 ± 4,9		113	38	76,1 ± 4,2	
G3	39	17	57,9 ± 9,4		47	25	46,5 ± 8,2	
Gefäßinvasion				0,03				0,08
nicht erkennbar	139	34	77,5 ± 4,0		183	59	74,6 ± 3,4	
positiv	30	14	65,9 ± 9,3		38	17	63,7 ± 8,1	
Östrogenrezeptor-status				0,50				0,15
negativ	52	14	82,8 ± 6,1		58	23	68,3 ± 6,4	
positiv	80	18	79,5 ± 4,9		100	28	73,8 ± 4,7	
c-erbB2 Status				0,76				0,29
-	60	19	75,4 ± 6,0		73	27	73,3 ± 5,4	
+	31	7	85,8 ± 6,6		35	9	77,0 ± 7,7	
++	22	4	76,9 ± 10,5		24	7	65,2 ± 10,7	
+++	18	5	81,6 ± 9,6		19	9	54,7 ± 12,2	
Tumorproliferation				0,0007				0,63
MIB-1 <20%	93	16	88,6 ± 3,6		110	35	72,3 ± 4,5	
MIB-1 ≥20%	26	10	65,8 ± 11,0		32	10	69,0 ± 8,6	
Alter				0,08				0,34
<60 Jahre	84	31	72,8 ± 5,3		109	35	79,0 ± 4,1	
>60 Jahre	85	17	78,8 ± 5,0		112	41	66,7 ± 4,7	

3.5 Multivariate Überlebensanalyse

In die multivariate Überlebensanalyse wurden die Faktoren einbezogen, welche in der univariaten Analyse sowohl im rezidivfreien- als auch im Gesamtüberleben signifikante Korrelationen aufgewiesen hatten: die absolute Anzahl positiver Lymphknoten, die Tumorgröße und der histologische Differenzierungsgrad. Zusätzlich wurde das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in die Analyse aufgenommen.

In der Analyse des rezidivfreien Überlebens wurde deutlich, daß die Anzahl positiver Lymphknoten die größte prognostische Relevanz ($p < 0,0005$; RR 1,09 {95%CI 1,05-1,14}) besitzt. Eine erhöhte COX-2 Expression erreichte in dieser Betrachtung grenzwertige Signifikanz ($p = 0,049$; RR 1.90 {95%CI 1,004-3,59}).

Weiterhin stellten sich das Gesamtgrading und der G3-Status unabhängig betrachtet als signifikant heraus.

In der Betrachtung des Gesamtüberlebens erreichten folgende Faktoren als unabhängige Parameter statistische Signifikanz: Anzahl positiver Lymphknoten, Tumorgröße und Alter der Patientinnen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Multivariate Überlebensanalyse (COX Regressionsmodell)

Merkmal	rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	RR	95% CI	p-Wert	RR	95% CI	p-Wert
COX-2 Expression			0,049			0,64
negativ	1,0			1,0		
positiv	1,9	1,004 – 3,59	0,049	1,14	0,67 – 1,93	0,64
Anzahl positiver Lymphknoten						
1,09	1,05 – 1,14	<0,0005	1,05	1,01 – 1,08	0,0005	
Tumorgroße (mm)						
0,97	0,94 – 1,00	0,057	1,03	1,01 – 1,05	0,005	
Differenzierungsgrad						
G1	1,0			1,0		
G2	2,86	0,84 – 9,78	0,09	1,23	0,62 – 2,43	0,55
G3	5,38	1,48 – 19,56	0,01	2,13	0,96 – 4,76	0,06
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (Jahre)						
0,99	0,96 – 1,01	0,33	1,02	1,003 – 1,05	0,03	

3.6 Zelllinien

Ergänzend zu den immunhistochemischen Untersuchungen wurden 2 Mammakarzinomzelllinien (MCF7; SK-BR-3) auf die Expression der COX-1 und -2 mit Hilfe des Western Blot untersucht. Es zeigte sich, daß beide Zelllinien eine geringe basale Expression der COX-2 aufwiesen, die unter Zugabe von IL-1 β und TPA stimulierbar gewesen ist (Abb. 21, Abb. 22).

Die COX-1 war in beiden Zelllinien im Western Blot nicht darstellbar.

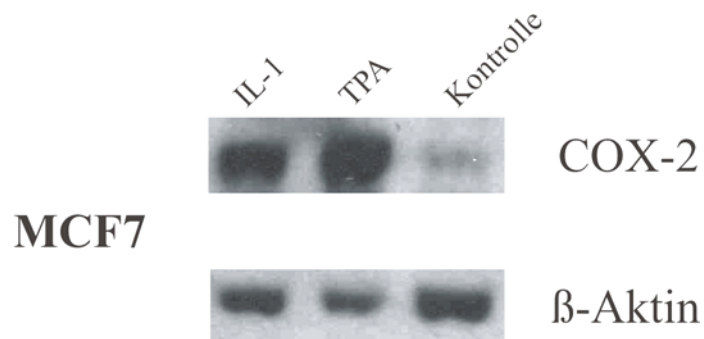


Abb. 21: Darstellung der COX-2 Expression in MCF7 mit Hilfe des Western Blot.
Positivkontrolle: Expression von β -Aktin

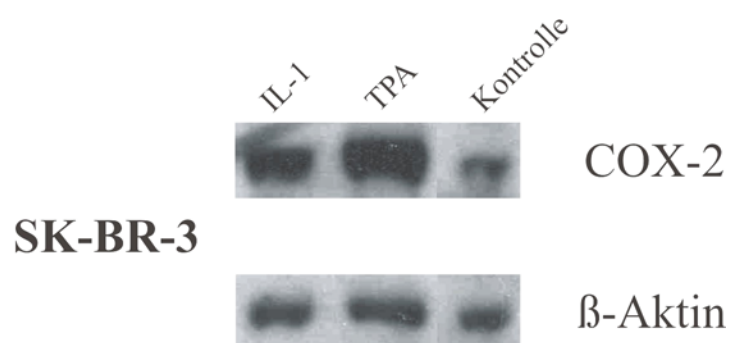


Abb. 22: Darstellung der COX-2 Expression in SK-BR-3 mit Hilfe des Western Blot.
Positivkontrolle: Expression von β -Aktin

3.7 Immunhistochemische Ergebnisse

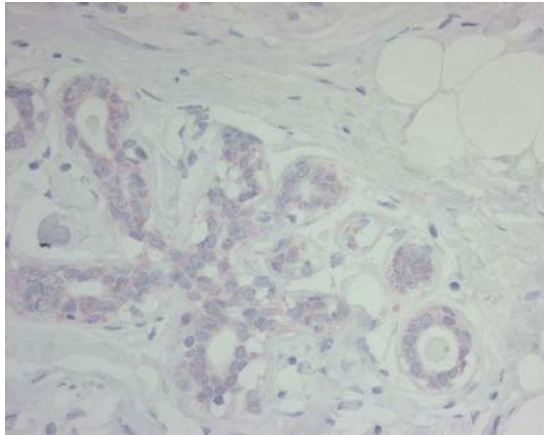


Abb. 23: COX-2 negativ Normalgewebe

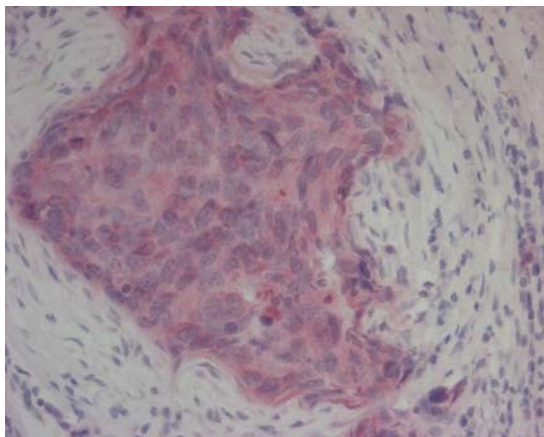


Abb. 24: COX-2 IRS 12

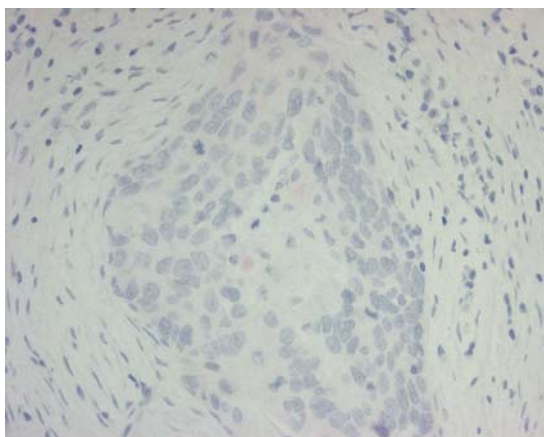


Abb. 25: COX-2 mit Peptid

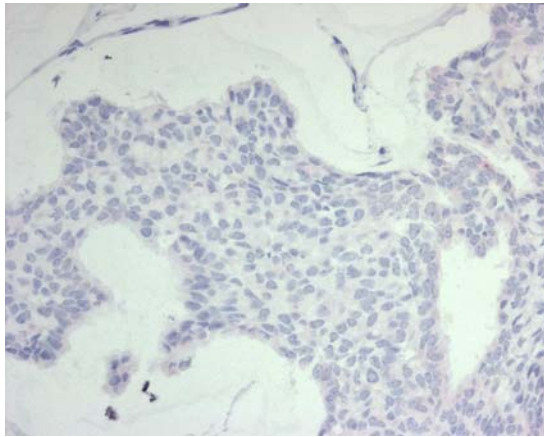


Abb. 26: COX-2 negativ IRS 0

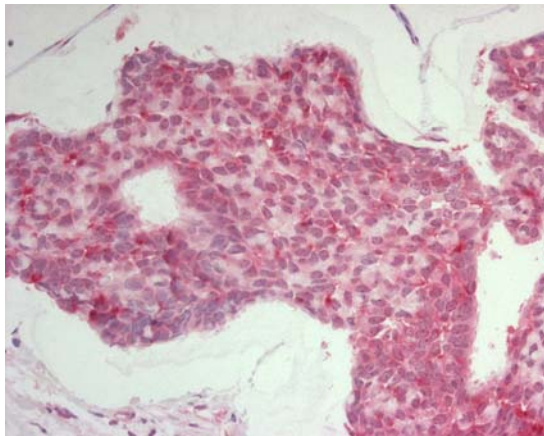


Abb. 27: COX-1 IRS 12

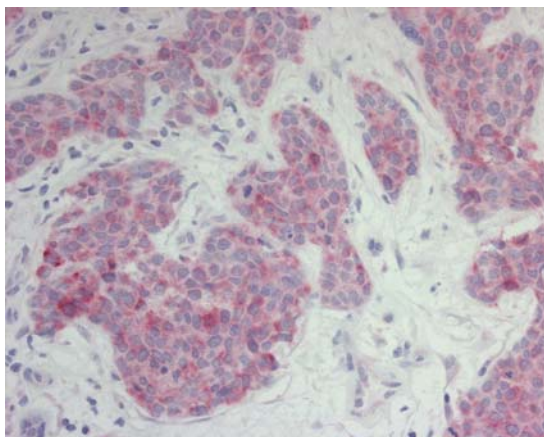


Abb. 28: COX-2 IRS 12

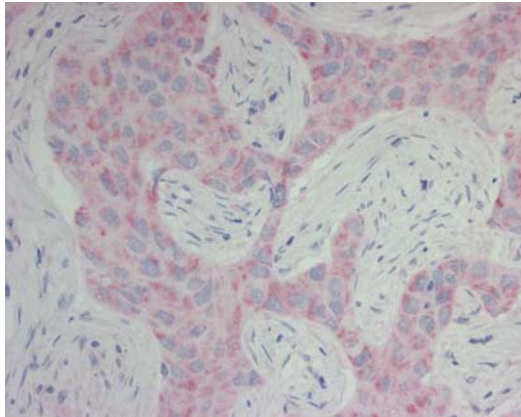


Abb. 29: COX-2 IRS 8

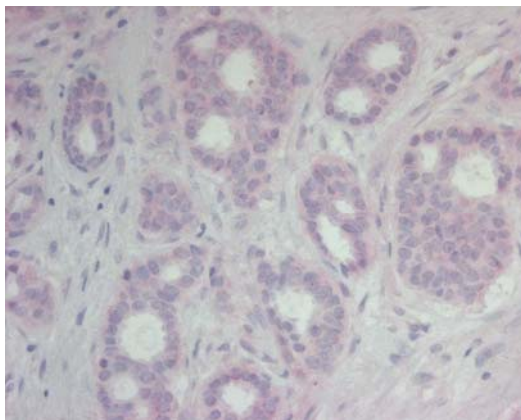


Abb. 30: COX-2 IRS 4

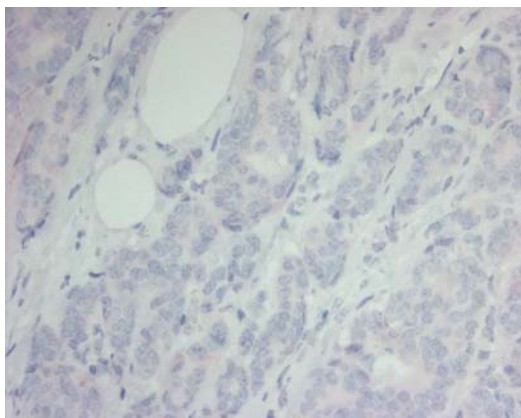


Abb. 31: COX-2 negativ IRS 0

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluß beider Isoformen der Cyclooxygenase auf die Prognose des Mammakarzinoms untersucht. Es konnten deutliche Unterschiede sowohl in Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern als auch in Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen der COX-1 und der COX-2 festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse kennzeichnen die COX-2 als einen Prognosefaktor. Die COX-1 erlangt in dieser Studie jedoch keine prognostische Relevanz.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Expression der Cyclooxygenase in zwei humanen Mammakarzinomzelllinien mit Hilfe des Western Blots untersucht. Sowohl MCF7 als auch SK-BR-3 zeigten in der vorliegenden Arbeit eine basale Expression der COX-2, die durch IL-1 β und TPA stimulierbar war. TPA und IL-1 β sind bereits für andere Zelllinien als Induktoren der Cyclooxygenase beschrieben worden. Der Phorbolester TPA stimuliert die Proteinkinase C durch Imitation der Effekte des Diacylglycerols und erhöht auf diesem Weg das intrazelluläre cAMP. IL-1 β induziert die Transkription der Cyclooxygenase u.a. durch Aktivierung von NF- κ B [29].

4.1 Korrelationen der COX-2 mit prognostisch ungünstigen Faktoren

Eine erhöhte COX-2 Expression korreliert in der vorliegenden Arbeit signifikant mit duktalem Karzinom, einer Tumorgröße >20 mm, einem positiven Lymphknotenstatus, einer fortgeschrittenen histologischen Entdifferenzierung, einer positiven Gefäßinvasion sowie einem negativen Östrogenrezeptorstatus, welche größtenteils mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert sind.

Die Expression der COX-2 im Mammakarzinom wurde neben den eigenen Untersuchungen [30] auch in verschiedenen Studien anderer Autoren untersucht. Tabelle 10 faßt diese zusammen.

Tabelle 10: Häufigkeit der COX-2 Expression im primären Mammakarzinom

Autor	Material	COX-2 Expression (%)	Korrelationen der COX-2 mit klinisch-pathologischen Parametern
Soslow et al. [31], 2000	16 invasiv-duktales Karzinome, 1 invasiv-lobuläres Karzinom, 3 DCIS	insgesamt: 56% positiv	nicht untersucht
Costa et al. [32], 2002	46 invasiv-duktales Karzinome	17,4% positiv	Gefäßinvasion, Lymphknotenmetastasierung, Apoptose-Index, Sialyl-Tn
Half et al. [25], 2002	42 invasive Karzinome, zusätzlich 16 DCIS	43% mittel/hoch 62,5% mittel/hoch	keine Korrelationen feststellbar
Ristimäki et al. [26], 2002	1576 invasive Karzinome	37,4% mittel/hoch	Lymphknotenmetastasierung, Differenzierungsgrad, Tumorgröße, histologischer Tumortyp, Ki-67, p53, Her-2/neu; Östrogenrezeptorstatus (invers)
Spizzo et al. [33], 2003	148 invasiv-duktales Karzinome, 45 invasiv-lobuläre Karzinome, 19 andere Karzinome	insgesamt 48,6% positiv	histologischer Tumortyp, Menopausaler Status, Ep-CAM
Davies et al. [34], 2003	80 invasive Karzinome	insgesamt 79% positiv, 54% stark positiv	CD 31
Lim [35], 2003	128 invasiv-duktales Karzinome	41% positiv	Differenzierungsgrad, Lymphknotenmetastasierung, Tumorgröße, VEGF, Cyclin D1
Wülfing et al. [36], 2003	192 invasive Karzinome	40,6% moderat bis stark positiv	Tumorgröße, Her-2/neu, Gefäßinvasion, MIB-1, Differenzierungsgrad; Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (inverse Korrelation)

Anhand dieser Studien wird deutlich, daß die Häufigkeit der COX-2 Expression in den einzelnen Arbeiten teilweise unterschiedlich beurteilt wird. Eine Ursache für die abweichenden Ergebnisse experimenteller Untersuchungen auf erhöhte Expression dieses Enzyms könnte in den unterschiedlichen Sensitivitäten der verwendeten Methoden (Western Blot, RT-PCR, Immunhistochemie) liegen.

Zusammenfassend ist jedoch erkennbar, daß die meisten der o.g. Arbeiten bei denen Immunhistochemie verwendet wurde, eine COX-2 Expression in ca. 40% der untersuchten Proben feststellen konnten.

Bezüglich der in Tabelle 10 aufgeführten Studien wird an dieser Stelle hinsichtlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur vorliegenden Arbeit detaillierter auf die Studie von Ristimäki et al. eingegangen. Die Daten dieser großen Multicenter Studie entstammen dem nationalen finnischen Krebsregister. Für die Analyse der COX-2 Expression wurden Gewebemicroarrays verwendet. Somit unterscheidet sich der Ansatz dieser Studie deutlich von dem der vorliegenden immunhistochemischen Arbeit, in welche alle 221 Fälle dem Mammazentrum der Charité entstammen. Der größte Teil der Patientinnen wurde in diesem vom selben Chirurgen operiert.

Trotz allem gibt es zwischen den Ergebnissen beider Studien Ähnlichkeiten. Beide stellten eine moderate bis starke COX-2 Expression in einem Drittel der invasiven Mammakarzinome fest. Weiterhin konnten beide Arbeiten signifikante Zusammenhänge zwischen der COX-2 Expression und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgroße, dem invasiv-duktalem Karzinom, dem histologischen Differenzierungsgrad und dem negativen Östrogenrezeptorstatus darlegen. Zusätzlich zu unserer Arbeit wurden weitere signifikante Korrelationen mit einer hohen Ki-67 Expression, einer hohen p53-Expression sowie einer HER-2 Amplifikation festgestellt. Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der prognostischen Relevanz werden ausführlicher im folgenden Kapitel erläutert.

Im Gegensatz zur Expression der COX-2 konnte in unserer Studie eine signifikant erhöhte COX-1 Expression in kleineren (≤ 20 mm) und nicht metastasierten (pN0) Tumoren festgestellt werden.

4.2 COX-2 als prognoserelevanter Überlebensparameter

Zusätzlich zu möglichen Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern untersuchten wir die prognostische Relevanz einer COX-2 Expression für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben mit Hilfe der univariaten Überlebensanalyse. In dieser zeigten wir, daß die COX-2 in beiden Erfassungszeiträumen einen prognostischen Einfluß besitzt, der im rezidivfreien Überleben noch deutlicher hervortritt.

Auch andere Studien haben den Einfluß der COX-2 Expression auf das Überleben untersucht. Hierbei wurden in den verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Endpunkte für die Überlebensanalyse verwendet. So wurde z.B. das rezidivfreie Überleben bei Ristimäki et al. als Zeit zwischen der Diagnosestellung und dem Auftreten von Fernrezidiven außerhalb des betroffenen Primärkarzinomgebietes oder dem Tod am Mammakarzinom definiert. Costa et al. dagegen grenzten das rezidivfreie Überleben als Zeit zwischen der Diagnosestellung und dem Tod ab. Trotz dieser Unterschiede fand sich inklusive unserer Untersuchungen in 4 von 6 Studien ein prognostischer Effekt der COX-2 (Tabelle 11).

Tabelle 11: COX-2 Expression als prognoserelevanter Überlebensparameter im Mammakarzinom

Autor	rezidivfreies Überleben (log rank test)	Gesamtüberleben (log rank test)
Ristimäki et al., 2002	p<0,0001	nicht untersucht
Costa et al., 2002	p=0,033	nicht untersucht
Spizzo et al., 2003	p=0,02	p=0,04
Wülfing et al., 2003	nicht signifikant	nicht signifikant
Lim, 2003	nicht signifikant	nicht signifikant

In der multivariaten Überlebensanalyse fanden wir heraus, daß die COX-2 Expression innerhalb des rezidivfreien Überlebens mit einem relativen Risiko von 1,9 und einem 95% Konfidenzintervall von 1,00 bis 3,59 ($p=0,049$) korreliert. Trotz des für diese Schätzungen geringen Stichprobenumfanges deuten diese Ergebnisse an, daß die COX-2 Expression innerhalb unseres Kollektivs ein unabhängiger Prognoseparameter für einen ungünstigen Krankheitsverlauf beim primären Mammakarzinom ist.

Ristimäki et al. konnten in ihrer Analyse dagegen nur die Unabhängigkeit der Anzahl positiver Lymphknoten, der Tumorgroße, eines negativen Progesteronrezeptorstatus, einer mäßigen bis fehlenden histologischen Differenzierung und einer HER-2 Amplifikation nachweisen.

Auch Spizzo et al. zeigten die Unabhängigkeit der Anzahl positiver Lymphknoten, die Tumorgroße, die Überexpression von Ep-CAM in beiden untersuchten Überlebenszeiträumen sowie zusätzlich für das Gesamtüberleben die histologische Differenzierung. Die COX-2 Expression erwies sich auch hier nicht als unabhängiger Faktor.

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefert die Homogenität unseres Kollektivs, die durch denselben Operateur für die Mehrzahl der Fälle entstanden ist. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, ob die COX-2 auch in diesen ein unabhängiger Prognosemarker ist.

Eine prognostische Relevanz der COX-2 konnte auch für andere Tumoren festgestellt werden, so z. B. Ovarialkarzinom (Denkert et al. [37], 2002; $p=0,04$), Kolonkarzinom (Masunaga et al. [38], 2000; $p=0,037$) und Gliom (Shono et al. [39]; $p<0,0001$).

4.3 Unterstützende Ergebnisse aus Tier- und Zellkulturmodellen

Jacoby RF et al. [40] stellten im APC-mutierten Min Mouse Model die Effekte des NSAIDs Piroxicam denen des selektiven COX-2 Inhibitors Celecoxibs gegenüber. Celecoxib verursachte eine deutliche ($p<0,01$) Reduktion in Inzidenz und Größe der Tumoren in einer dosisabhängigen Weise. Weiterhin traten die bei NSAIDs bekannten Nebenwirkungen wie Ulzerationen oder Blutungen im Gastrointestinaltrakt unter diesem Medikament im Gegensatz zur Einnahme von Piroxicam nicht auf.

Harris et al. [41] untersuchten den Einfluß von Celecoxib auf Mammakarzinome in insgesamt 120 Ratten. Diese wurden gleichmäßig auf 3 Gruppen verteilt und mit einem Standard-Tierfutter ohne Zusätze (Kontrollgruppe), mit 1500 mg/kg Celecoxib bzw. 1500 mg/kg Ibuprofen als Zusatz gefüttert. Nach 7 Tagen wurde jedem Tier eine intragastrische Dose von 15 mg DMBA verabreicht und die jeweilige Fütterung für weitere 105 Tage fortgesetzt. Die Ratten der Celecoxib-Gruppe zeigten eine deutliche Reduktion in Inzidenz, Vielfalt und Volumen der entwickelten Mammakarzinome im Bezug zur Kontrollgruppe (68%, 86%, 81%; $p < 0,001$). Auch Ibuprofen erzielte signifikante Effekte in den oben genannten Kategorien, die jedoch deutlich geringer verglichen mit der Celecoxib-Gruppe ausfielen (40%, 52%, 57%; $p < 0,001$). Somit zeigte der selektive COX-2 Inhibitor in dieser Studie das größte chemopräventive Potential gegen das Mammakarzinom.

Eine deutliche Inhibierung der Anzahl vorhandener Tumore in verschiedenen Tiermodellen durch NSAIDs konnte u.a. in folgenden Studien festgestellt werden:

Tabelle 12: Wirkung von NSAIDs in intestinalen Tumoren (nach Howe LR et al., 2000)

Autor	Tier	Tumortyp	Pharmakon	Inhibierung
Kawamori et al., 1998	Ratte	Kolonkarzinom	Celecoxib	97%
Fukutake et al., 1998	Maus	Kolonkarzinom	Nimesulide	81%
Nakatsugi et al., 1997	Maus	Adenom	Nimesulide	48%

Zur Untersuchung der COX-2 Expression in Zellkulturen wurde in der vorliegenden Arbeit insbesondere auf MCF7 und SK-BR-3 eingegangen.

Liu et al. [42] fanden bei Untersuchung der östrogenabhängigen und nicht metastasierenden Zelllinie MCF7 ähnliche Ergebnisse wie die der vorliegenden Arbeit: eine kaum erkennbare basale, jedoch stimulierbar durch TPA eine vorübergehend erhöhte Expression der COX-2. Sie konnten jedoch zusätzlich eine verhältnismäßig hohe basale Expression der COX-1 in dieser Zelllinie nachweisen.

Dagegen zeigten Half et al. in ihrer Studie, daß MCF7 keine basale Expression der COX-2 aufwies. Ebenso wenig exprimierte auch SK-BR-3 als wenig invasive und östrogenabhängige Zelllinie die COX-2. Weiterhin untersuchten sie den möglichen Einfluß von HER-2 auf die COX-2 Expression. Dafür transfizierten sie MCF7 Zellen mit HER-2 und stellten im Fall der Transfektanten eine positive COX-2 Expression fest. Die These einer möglichen COX-2 Induktion durch HER-2 wird auch in weiteren Arbeiten belegt.

4.4 Mögliche Erklärungen für eine präferente Expression der COX-2

Wie in Kapitel 1.2 bereits ausführlicher beschrieben wurde, gibt es enge Zusammenhänge zwischen der Tumorgenese und inflammatorischen Prozessen. Die Expression der COX-2 ist in diesem Zusammenhang u.a. induzierbar durch inflammatorische Zytokine, wie Interleukin1- β oder Tumor Nekrose Faktor. Die COX-1 wird dagegen konstitutiv exprimiert.

PGE₂, ein Prostaglandin mit proinflammatorischen Eigenschaften (Vasodilatation, Hyperalgesie), wird hauptsächlich durch die COX-2 gebildet. Die COX-1, als „housekeeping gene“, erzeugt hingegen v.a. Prostaglandine mit entsprechenden physiologischen Funktionen (plättchenabhängige Homöostase, Regulation der Nierendurchblutung, Integrität der Mukosa des Magens) [43]. Ein erhöhter Gehalt an Prostaglandinen konnte in vielen malignen Tumoren festgestellt werden. Diese tragen über verschiedene Mechanismen zur Tumorgenese bei. So stimulieren PGE₁ und PGE₂ in Gegenwart von EGF die Proliferation von epithelialen Zellen der Mamma [15]. Huang et al. zeigten in ihrer Arbeit die immunsupprimierenden Eigenschaften des PGE₂ am Beispiel des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms auf [44]. Auf diese Weise

könnte sich der Tumor der Überwachung durch das Immunsystems entziehen.

Auch strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoenzymen können die Ursache für eine vermehrte Expression der COX-2 in malignen Tumoren sein. So verfügt die COX-2 aufgrund eines veränderten Aminosäurerestes um ein größeres aktives Zentrum und ist somit für alternative Substrate empfänglich [12]. Bezüglich der Transkriptionsebene lassen sich ebenso Unterschiede feststellen. Der COX-2 Promoter beinhaltet mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, so z.B. das cAMP response element (CRE), NF-IL6 oder NF-κB. Über diese kann eine vermehrte Transkription der COX-2 induziert werden, die anschließend über die aufgeführten Prozesse fördernd auf die Tumorgenese wirken können.

4.5 Mechanismen der COX-2 in der Tumorgenese

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß eine erhöhte COX-2 Expression signifikant mit prognostisch ungünstigen Faktoren wie einer Metastasierung in Lymphknoten, einer Tumorgroße >20 mm oder einer positiven Gefäßinvasion korreliert. Dies spricht für ein erhöhtes tumorförderndes Potential der COX-2.

Die Invasionsfähigkeit maligner Tumoren ist wichtig für ihre Ausbreitung in entfernte Organe. Dabei ist die Proteolyse der Basalmembran, insbesondere des Kollagen Typ IV, einer der ersten wichtigsten Schritte. Viele Studien versuchten, einen möglichen Zusammenhang zwischen der COX-2 und dem invasiven Potential zu klären. So zeigten COX-2 stark positive intestinale Zellen der Ratte beispielsweise eine erhöhte Adhäsion zur extrazellulären Matrix, waren resistenter gegenüber induzierter Apoptose und verweilten länger in der G1-Phase des Zellzyklus [45][46]. Tsujii et al. [47] konnten in ihrer Arbeit mit der COX-2 transfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 diese Zusammenhänge ebenso besonders deutlich darstellen. So wies diese Zelllinie folglich eine höhere Produktion von Prostaglandinen, eine vergrößerte Aktivität der MMP-2 sowie eine durch Sulindac inhibierbare erhöhte Invasivität im Invasionsassay auf. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Induktion von Membrantyp-1 Metalloproteinase durch Cyclooxygenasen konnten durch Takahashi et al. [48] auch in der Mammakarzinomzelllinie Hs578T gemacht werden.

Die Angiogenese, definiert als Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden,

wird als wichtiger Schritt bezogen auf Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung angesehen. Davies et al. konnten in der in Tabelle 10 beschriebenen Untersuchung eine signifikante Korrelation zwischen der COX-2 Expression und CD 31, einem endothelialen Zellmarker der Angiogenese, darstellen. Dies bekräftigten weitere Arbeiten, so z.B. die Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF (vascular endothelial growth factor) [49][50]. Die COX-2 scheint direkt zu der Produktion von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor), transforming growth factor-1 u.a. beizutragen. Eine Gabe von NS-398, einem selektiven COX-2 Inhibitor, zu COX-2 positiven Zelllinien des Kolorektalen Karzinoms führte zu einer verringerten Sekretion dieser Faktoren und somit zu verringerten endothelialen tubulären Formationen in vitro [51]. Williams et al. [52] zeigten in COX-2 knockout Fibroblasten von Mäusen eine 94% Reduktion an der VEGF-Produktion im Vergleich zu den Wildtypfibroblasten. Selektive COX-2 Inhibitoren reduzierten auch in verschiedenen anderen in vivo Modellen (z.B. Kornea von Mäusen [53]) die Angiogenese. Ergänzend zur COX-2 scheint ebenso die COX-1 zur Angiogenese beizutragen. Jones et al. [54] machten in ihrer Studie ferner auf die Gemeinsamkeiten von selektiven und nicht selektiven NSAIDs bezüglich der Inhibierung der Angiogenese aufmerksam. Dies wird über verschiedene Mechanismen (z.B. Inhibierung von MAP-Kinase-Aktivität, Prostaglandin-abhängige und –unabhängige Mechanismen) erreicht.

Desweiteren stellte sich der Zusammenhang zwischen COX-2 Expression und verringerter Apoptose als interessanter Forschungsansatz zur Klärung des tumorfördernden Potentials der COX-2 dar. Eine verminderte Apoptose begünstigt das Überleben von mutierten Zellen, welches einen anderen wichtigen Aspekt der Tumorgenese darstellt. Sheng et al. [55] legten in ihrer Studie die Apoptoseinhibierung durch PGE₂ dar. Diese war begleitet durch eine Induktion von Bcl-2. In mehreren Arbeiten wurde die Fähigkeit von bestimmten NSAIDs zur Induktion der Apoptose gezeigt. Diese Beobachtungen konnten jedoch teilweise auch auf Zellen übertragen werden, die keine Expression der COX-2 aufwiesen. Dies führte zu der Annahme, daß NSAIDs die Apoptose über COX-abhängige und –unabhängige Mechanismen stimulieren können [56].

Obwohl die aufgeführten Studien mehrere Erklärungsansätze zur Rolle der COX-2 in der Tumorentwicklung bieten, sind weitere Studien nötig, um diese zu untersuchen.

4.6 Therapeutischer Ausblick

Nach den vielfältigen Ergebnissen epidemiologischer Studien (Kapitel 1.7) und den tierexperimentellen Studien haben nun gezielte klinische Studien mit selektiven COX-2 Inhibitoren an Tumorpatienten begonnen. Nach Informationen von Pharmacia oncology, einem Anbieter von Celebrex[®], werden derzeit die in Tabelle 13 aufgeführten klinischen Studien mit Celecoxib als Therapeutikum im Mammakarzinom durchgeführt (Stand: Oktober 2002).

Tabelle 13: Klinische Studien mit Celebrex[®]

Name der Studie; Anzahl der Probanden	Charakterisierung des Patientenkollektivs	Zusätzliche medikamentöse Therapie	Weitere Charakterisierung der Studie
Ginecor-Gercor trial; n=346	menopausale Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom	Exemestane	<ul style="list-style-type: none"> • randomisiert • Multicenter • doppelblind • Phase III
Royal infirmery phase III trial; n=210	Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom	keine	<ul style="list-style-type: none"> • randomisiert • Placebo- kontrolliert
FNCLCC phase II trial; n=210	Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom und kompletter oder partieller Regression oder unverändertem Tumor nach first- line Chemotherapie	keine	<ul style="list-style-type: none"> • randomisiert • Placebo- kontrolliert
CRLCC Gauducheau Nantes-Atlantic phase II trial; n=124	Postmenopausale Frauen mit operablem Mammakarzinom	Exemestane (neoadjuvant)	<ul style="list-style-type: none"> • randomisiert • Multicenter
Spanish phase II neoadjuvant trial; n=30	Frauen >65 Jahre mit Tumoren >3 cm	Exemestane (neoadjuvant)	

Desweiteren veranlaßte dasselbe Pharmaunternehmen diverse präklinische Studien (z.B. UK multicenter trial in DCIS) mit Celebrex[®].

Im Vergleich der Therapieeffizienz selektiver COX-2 Inhibitoren beim Mammakarzinom mit anderen malignen Tumoren muß die möglicherweise unterschiedliche Anzahl der COX-2 Expression in diesen berücksichtigt werden. So exprimieren Kolonkarzinome in einem höheren Anteil die COX-2 und könnten folglich in einem größeren Prozentsatz auf selektive COX-2 Inhibitoren ansprechen.

Selektive COX-2 Inhibitoren könnten in Zukunft eine Indikation in vielfältiger Weise erlangen. Als adjuvante Therapeutika könnten sie z.B. aufgrund ihrer Prostaglandin-vermittelten Stimulierung der Aromataseaktivität mit Aromataseinhibitoren kombiniert werden. Weiterhin bieten sich selektive COX-2 Inhibitoren zur Prophylaxe bei Hochrisikopatientinnen an.

Durch weitere Studien sollte der Einfluß von Prostaglandin-abhängigen und –unabhängigen Mechanismen der NSAIDs untersucht werden, um auch die Rolle dieser Medikamente in der Therapie des Mammakarzinoms genauer zu klären.

5. Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] Stabenow R, Eisinger B (2001): Epidemiologische Daten zum weiblichen Brustkrebs aus dem Gemeinsamen Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen. Schriftenreihe des GKR 1/ 2001: 40
- [2] Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002): Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 52: 23-47
- [3] Kreienberg R, Volm T, Alt D (2002): Krankheitsbild: Mammakarzinom. In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.): Management des Mammakarzinoms. 2. Auflage. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York, 3-6
- [4] Riede UN, Wittekind C, Sterry W (1999): Epidermodermales System. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Thieme. Stuttgart New York, 954-961
- [5] Arun B, Hortobagyi GN (2002): Progress in breast cancer chemoprevention. Endocr Relat Cancer 9: 15-32
- [6] Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A (2002): Onkologie 2002/ 2003, Empfehlungen zur Therapie. 11. Auflage. W. Zuckerschwerdt Verlag GmbH, 127-146
- [7] Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow?. Lancet 357: 539-545
- [8] Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. N Engl J Med 315: 1650-1659
- [9] Hauptmann S (2000): Die Rolle der Entzündung bei der Tumordinvasion. Verh. Dtsch. Ges. Path. 84: 77-86

- [10] Vane JR (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-235
- [11] Vane JR, Flower RJ, Botting RM (1990): History of Aspirin and its mechanism of action. *Stroke* 21 (4): IV12-23
- [12] Taketo MM (1998): Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst.* 90 (20): 1529-1536
- [13] Stack E, DuBois RN (2001): Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15 (5): 787-800
- [14] Hla T, Bishop- Bailey D, Liu CH, Schaefer HJ, Trifan OC (1999): Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 551-557
- [15] Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ (2001): Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8: 97-114
- [16] Taketo MM (1998): Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst.* 90 (21): 1609-1620
- [17] Cannon GW, Brezdveld FC (2001): Efficacy of Cyclooxygenase- 2- specific inhibitors. *Am J Med* 110 (3A): 6S-12S
- [18] Brune K, Kalden J, Zacher J, Zeilhofer HU (2000): Selektive Inhibitoren der Zykoxygenase 2. *Deutsches Ärzteblatt* 97 (26): A-1818-A1825
- [19] Phillips RKS, Wallace MH, Lynch PM, Hawk E, Gordon GB, Saunders BP, Wakabayashi N, Shen Y, Zimmerman S, Godio L, Rodrigues-Bigas M, Su L-K, Sherman J, Kelloff G, Levin B, Steinbach G, the FAP Study Group (2002): A randomised, double blind, placebo controled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut*.50 (6):857-860
- [20] Khuder SA, Mutgi AB (2001): Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *Br J Cancer* 84 (9): 1188-1192

- [21] Johnson TW, Anderson KE, Lazovich DA, Folsom AR (2002): Association of Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1586-1591
- [22] Elston CW, Ellis IO (1991): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 5: 403-410
- [23] Sobin LJ, Wittekind L (2002): TNM classification of malignant tumors. Wiley-Liss, 6. ed.
- [24] Remmele W, Stegner HE (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8: 138-140
- [25] Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA (2002): Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62: 1676-1681
- [26] Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J (2002): Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62: 632-635
- [27] Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF (2001): Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: Prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 61: 4375-4381
- [28] Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N (2000): Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res* 6: 4064-4068
- [29] Newton R, Kuitert LME, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ (1997): Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* (237): 28-32

- [30] Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S. (2003): Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97 (12): 2978-2987
- [31] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rudh D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT (2000): COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89 (12): 2637-2645
- [32] Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt FC (2002): Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 55: 429-434
- [33] Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P (2003): Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer* (88): 574-578
- [34] Davies G, Salter J, Hills M, Martin L-A, Sacks N, Dowsett M (2003): Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin. Cancer Res* 9: 2651-2656
- [35] Lim SC (2003) : Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep.* 10 (5): 1241-1249
- [36] Wülfing P, Diallo R, Müller C, Wülfing C, Poremba C, Heinecke A, Rody A, Greb RR, Böcker W, Kiesel L (2003): Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 375-382
- [37] Denkert C, Köbel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S (2002): Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 160: 893-903

- [38] Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N (2000): Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 6 (10): 4064-4068
- [39] Shono T, Tofilon PJ, Brunner JM, Owolabi O, Lang FF (2001): Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 61: 4375-4381
- [40] Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA (2000): The cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the Min Mouse Model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* (60): 5040-5044
- [41] Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K (2000): Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res* 60: 2101-2103
- [42] Liu XH, Rose DP (1996): Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56: 5152-5157
- [43] Parente L, Perretti M (2003): Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol* 65: 153-159
- [44] Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM (1996): Non-small lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol* 157 (12): 5512-5520
- [45] Tsujii M, DuBois RN (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83 (3): 493-501

- [46] DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD (1996): G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 56 (4): 733-737
- [47] Tsujii M, Kawano S, DuBois RN (1997): Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3336-3340
- [48] Takahashi Y, Kawahara F, Noguchi M, Miwa K, Sato H, Seiki M, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T (1999): Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2. *FEBS Lett* 460 (1): 145-148
- [49] Lim SC, Park SY, Do NY (2003): Correlation of cyclooxygenase-2 pathway and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 10 (5): 1073-1079
- [50] Chu J, Lloyd FL, Trifan OC, Knapp B, Rizzo MT (2003): Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* (1): 1-7
- [51] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998): Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 94 (2): following 271
- [52] Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN (2000): Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.* 105: 1589-1594
- [53] Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ (1999): Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 59: 4574-4577
- [54] Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS (1999): Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 12 (5): 1418-1423

- [55] Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN (1998): Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58 (2): 362-366
- [56] Rigas B, Shiff SJ (2000): Is inhibition of cyclooxygenase required for the chemopreventive effect of NSAIDs in colon cancer? A model reconciling the current contradiction. *Med Hypotheses* 54 (2): 210-221

Persönliche Angaben

Name	Berit Maria Müller
Geburtsdatum / -ort	23.01.1979 / Bernau (bei Berlin)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulabschluß	Allgemeine Hochschulreife

Tabellarischer Lebenslauf

1985 – 1991	Wilhelm-Pieck-Oberschule Bernau
1991 – 1998	Gymnasium Bernau
Juni 1998	Abitur
seit Oktober 1998	Studium der Humanmedizin an der Humboldt Universität zu Berlin
September 2000	Physikum
September 2001	1. Staatsexamen
September 2004	2. Staatsexamen

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Berit Maria Müller, geboren am 23.01.1979 in Bernau (bei Berlin), daß diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Die Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die genutzte Literatur sind vollständig angegeben.

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Hauptmann danken, der mir die Arbeit anvertraut hat, innerhalb seiner Arbeitsgruppe ein sehr angenehmes Arbeitsklima geschaffen hat und mich durch sein stets interessiertes Verhalten immer wieder motiviert hat. Weiterhin möchte ich meinem Betreuer Carsten Denkert danken, der jederzeit für anfallende Probleme erreichbar war und mir durch seine ausdauernde Korrekturfähigkeit dieser Dissertation zu vielen Anregungen verholfen hat.

Besonderer Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, hier insbesondere Ines Koch, die mir mit unermüdlicher Ausdauer die praktischen Fertigkeiten beigebracht hat, sowie Wilko Weichert, der mir bei allen auftretenden Problemen hilfreich und geduldig zur Seite gestanden hat.

Ebenso möchte ich meinen Eltern Wiltrudis und Josef für deren Unterstützung, Vertrauen und die Hoffnung auf Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank besonders meinen Mitdoktoranden Alexandra und Wolfgang, deren Freundschaft mir auch über Labor- und Formatierungsprobleme hinaus sehr geholfen hat. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Kathi danken, die mir seit unserem ersten Tag an dieser Universität bei allen auftretenden Schwierigkeiten unzählige Male geduldig zugehört und geholfen hat. Ebenso gilt mein Dank Adrian und Holger, die mit ihrem PC-Wissen einige Katastrophen beseitigt haben sowie meiner lieben Mitbewohnerin Dörte für alle aufmunternden Worte. Außerdem danke ich Georg für die angenehme Laborzeit.

Publikationsverzeichnis

Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S (2003): Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97(12): 2978-2987

Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, Muller BM, Noske A, Niesporek S, Kristiansen G, Guski H, Dietel M, Hauptmann S (2004): Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10 (16): 5580-5586

Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Muller BM, Niesporek S, Dietel M, Denkert C (2005): Polo like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Archiv* (in press).

Eigene Kongressbeiträge

1. Poster

American Association for Cancer Research (AACR) 94th Annual Meeting, July 11-14, 2003, Washington D.C.: # 103053 Increased expression of cyclooxygenase 2 is a negative prognostic factor for patients with breast carcinoma

2. Vortrag

23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie; München, 19.-21.06.2003: Expression und Prognoserelevanz der COX-1 und COX-2 im primären Mammakarzinom; honoriert mit dem Vortragspreis der Jahrestagung